



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA**

**REBECA THAÍS FERREIRA FALCÃO**

**EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM KAEMPFEROL SOBRE A  
MORFOLOGIA ÓSSEA DE RATOS SUBMETIDOS A PARALISIA CEREBRAL  
EXPERIMENTAL**

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**CENTRO ACADÊMICO DA VITÓRIA**

**ENFERMAGEM**

**REBECA THAÍS FERREIRA FALCÃO**

**EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM KAEMPFEROL SOBRE A  
MORFOLOGIA ÓSSEA DE RATOS SUBMETIDOS A PARALISIA CEREBRAL  
EXPERIMENTAL**

TCC apresentado ao Curso de Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico da Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

**Orientador(a):** Profa. Dra. Ana Elisa Toscano  
Meneses da Silva Castro

**Coorientador(a):** Ma. Márcia Maria da Silva

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**

**2023**

REBECA THAÍS FERREIRA FALCÃO

**EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM KAEMPFEROL  
SOBRE A MORFOLOGIA ÓSSEA DE RATOS SUBMETIDOS A  
PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

TCC apresentado ao Curso de Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Aprovado em: 11 / 09 / 2023.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Carolina Peixoto Magalhães (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profa. Dra. Rosana Christine Cavalcanti Ximenes (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

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

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A paralisia cerebral é uma alteração neurológica não progressiva resultante de lesões permanentes no cérebro, que afetam o tônus muscular, a postura e os movimentos, sendo reconhecida como a principal causa de problemas motores durante a infância. Dentre as complicações associadas à paralisia cerebral, destaca-se a osteopenia. No entanto, pesquisas indicam que o kaempferol devido as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, pode ter efeitos benéficos na proteção neurológica e no metabolismo ósseo. **OBJETIVO:** Avaliamos o efeito do tratamento neonatal com kaempferol em ratos submetidos à paralisia cerebral experimental sobre parâmetros morfológicos ósseos. **MÉTODOS:** Foram utilizados 48 ratos machos da linhagem Wistar distribuídos nos subgrupos: a) Controle Veículo (CV), b) Controle Kaempferol (CK), c) Paralisia Cerebral Veículo (PCV), d) PC Kaempferol (PCK). Após o desmame, os animais foram separados em gaiolas individuais até os 36 dias de vida pós-natal, quando foram eutanasiados para coleta e análise de tecidos ósseos. **RESULTADOS:** Observamos redução do peso e do comprimento absoluto da tíbia pela paralisia cerebral, o kaempferol, por sua vez, apenas aumentou o número de lacunas de osteócitos da tíbia. **CONCLUSÃO:** Os dados obtidos em nosso estudo podem contribuir para a o estudo e inclusão de estratégias nutricionais e farmacológicas terapêuticas a fim de atenuar os déficits ósseos de crianças acometidas pela PC.

Palavras-chave: Paralisia cerebral; Osteopenia; Flavonoides.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Cerebral palsy is a non-progressive neurological change resulting from permanent injuries to the brain, which affect muscle tone, posture and movements, and is recognized as the main cause of motor problems during childhood. Among the complications associated with cerebral palsy, osteopenia stands out. However, research indicates that kaempferol, due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, may have beneficial effects on neurological protection and bone metabolism. **OBJECTIVE:** We evaluated the effect of neonatal treatment with kaempferol in rats subjected to experimental cerebral palsy on bone morphological parameters. **METHODS:** 48 male Wistar rats were used, divided into subgroups: a) Vehicle Control (CV), b) Kaempferol Control (CK), c) Cerebral Palsy Vehicle (PCV), d) PC Kaempferol (PCK). After weaning, the animals were separated into individual cages until 36 days of postnatal life, when they were euthanized for bone tissue collection and analysis. **RESULTS:** We observed a reduction in the weight and absolute length of the tibia due to cerebral palsy; kaempferol, in turn, only increased the number of tibial osteocyte lacunae. **CONCLUSION:** The data obtained in our study can contribute to the study and inclusion of nutritional and pharmacological therapeutic strategies in order to mitigate bone deficits in children affected by CP.

Keywords: Cerebral palsy; Osteopenia; Flavonoids.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
2.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	10
2.2 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	11
2.3 PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL .....	12
2.4 TRATAMENTO COM KAEMPFEROL .....	13
2.5 EUTANÁSIA .....	14
2.6 ANÁLISES EXPERIMENTAIS .....	14
2.6.1 AFERIÇÃO DO PESO E COMPRIMENTO DA TÍBIA: .....	14
2.6.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA DA TÍBIA: .....	14
2.6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA: .....	15
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>16</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>20</b>
REFERÊNCIAS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....</b>	<b>21</b>
<b>ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA.....</b>	<b>25</b>

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELA REVISTA **NEUROCIÊNCIAS**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS SE ENCONTRAM NO ANEXO B.

**Efeitos do tratamento neonatal com kaempferol sobre a morfologia óssea de ratos submetidos à paralisia cerebral**

***Effects of neonatal kaempferol treatment on bone morphology in rats submitted to cerebral palsy***

***Efectos del tratamiento neonatal con kaempferol en la morfología ósea en ratones sometidos a parálisis cerebral***

Rebeca Thaís Ferreira Falcão<sup>a,b</sup>, Márcia Maria da Silva<sup>b,c</sup>, Ana Elisa Toscano<sup>b,d</sup>.

<sup>a</sup> *Graduanda em Enfermagem pela Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil*

<sup>b</sup> *Unidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotópica, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil*

<sup>c</sup> *Programa de pós-graduação em Nutrição, Centro de Ciências Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil*

<sup>c</sup> *Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil*

<sup>d</sup> *Department de Enfermagem, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil*

*Endereço para correpondência:*

*Ana Elisa Toscano, PhD.*

*Departamento de Enfermagem, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.*

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** A paralisia cerebral é uma alteração neurológica não progressiva resultante de lesões permanentes no cérebro, que afetam o tônus muscular, a postura e os movimentos, sendo reconhecida como a principal causa de problemas motores durante a infância. Dentre as complicações associadas à paralisia cerebral, destaca-se a osteopenia. No entanto, pesquisas indicam que o kaempferol devido as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, pode ter efeitos benéficos na proteção neurológica e no metabolismo ósseo. **OBJETIVO:** Avaliamos o efeito do tratamento neonatal com kaempferol em ratos submetidos à paralisia cerebral experimental sobre parâmetros morfológicos ósseos. **MÉTODOS:** Foram utilizados 48 ratos machos da linhagem Wistar distribuídos nos subgrupos: a) Controle Veículo (CV), b) Controle Kaempferol (CK), c) Paralisia Cerebral Veículo (PCV), d) PC Kaempferol (PCK). Após o desmame, os animais foram separados em gaiolas individuais até os 36 dias de vida pós-natal, quando foram eutanasiados para coleta e análise de tecidos ósseos. **RESULTADOS:** Observamos redução do peso e do comprimento absoluto da tíbia pela paralisia cerebral, o kaempferol, por sua vez, apenas aumentou o número de lacunas de osteócitos da tíbia. **CONCLUSÃO:** Os dados obtidos em nosso estudo podem contribuir para a o estudo e inclusão de estratégias nutricionais e farmacológicas terapêuticas a fim de atenuar os déficits ósseos de crianças acometidas pela PC.

Palavras-chave: Paralisia cerebral; Osteopenia; Flavonoides.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Cerebral palsy is a non-progressive neurological change resulting from permanent injuries to the brain, which affect muscle tone, posture and movements, and is recognized as the main cause of motor problems during childhood. Among the complications associated with cerebral palsy, osteopenia stands out. However, research indicates that kaempferol, due to its antioxidant and anti-inflammatory properties, may have beneficial effects on neurological protection and bone metabolism. **OBJECTIVE:** We evaluated the effect of neonatal treatment with kaempferol in rats subjected to experimental cerebral palsy on bone morphological parameters. **METHODS:** 48 male Wistar rats were used, divided into subgroups: a) Vehicle Control (CV), b) Kaempferol Control (CK), c) Cerebral Palsy Vehicle (PCV), d) PC Kaempferol (PCK). After weaning, the animals were separated into individual cages until 36 days of postnatal life, when they were euthanized for bone tissue collection and analysis. **RESULTS:** We observed a reduction in the weight and absolute length of the tibia due to cerebral palsy; kaempferol, in turn, only increased the number of tibial osteocyte lacunae. **CONCLUSION:** The data obtained in our study can contribute to the study and inclusion of nutritional and pharmacological therapeutic strategies in order to mitigate bone deficits in children affected by CP.

Keywords: Cerebral palsy; Osteopenia; Flavonoids.

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La parálisis cerebral es un cambio neurológico no progresivo resultante de lesiones permanentes en el cerebro, que afectan el tono muscular, la postura y los movimientos, y es reconocida como la principal causa de problemas motores durante la infancia. Entre las complicaciones asociadas a la parálisis cerebral destaca la osteopenia. Sin embargo, las investigaciones indican que el kaempferol, debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, puede tener efectos beneficiosos sobre la protección neurológica y el metabolismo óseo. **OBJETIVO:** Evaluamos el efecto del tratamiento neonatal con kaempferol en ratas sometidas a parálisis cerebral experimental sobre los parámetros morfológicos óseos. **MÉTODOS:** Se utilizaron 48 ratas Wistar macho, divididas en subgrupos: a) Vehículo Control (CV), b) Kaempferol Control (CK), c) Parálisis Cerebral Vehículo (PCV), d) PC Kaempferol (PCK). Después del destete, los animales fueron separados en jaulas individuales hasta los 36 días de vida posnatal, cuando fueron sacrificados para la recolección y análisis de tejido óseo. **RESULTADOS:** Observamos una reducción en el peso y la longitud absoluta de la tibia debido a la parálisis cerebral; el kaempferol, a su vez, solo

aumentó el número de lagunas de osteocitos tibiales. **CONCLUSIÓN:** Los datos obtenidos en nuestro estudio pueden contribuir al estudio e inclusión de estrategias terapéuticas nutricionales y farmacológicas con el fin de mitigar los déficits óseos en niños afectados por PC.

Palabras clave: Parálisis cerebral; Osteopenia; Flavonoides.

## 1. INTRODUÇÃO

A paralisia cerebral (PC) é uma das principais causas de incapacidade motora durante a infância. De acordo com a definição atual, a PC é um grupo de distúrbios permanentes do desenvolvimento do movimento e da postura, causando limitações de atividade que são atribuídas a distúrbios não progressivos que ocorreram no desenvolvimento do cérebro fetal ou infantil <sup>1</sup>. A causa mais comum da PC é a hipóxia, que é a falta de oxigênio na circulação <sup>2</sup>. Os especialistas ainda enfatizam que o quadro clínico da PC é frequentemente acompanhado por deficiências sensoriais, de percepção, cognição e comportamento, epilepsia e deformidades ósseas/musculares secundárias <sup>3</sup>.

Anualmente, são diagnosticados aproximadamente 30.000 a 40.000 novos casos <sup>4</sup>, além disso, a literatura aponta que a paralisia cerebral afeta aproximadamente 1,6 em cada 1000 nascidos vivos em países de alta renda, enquanto em países de baixa e média renda, a prevalência de nascimentos pré/perinatais com paralisia cerebral chega a 3,4 em cada 1000 nascidos vivos <sup>5</sup>. Dentre os fatores de predisponentes destacam-se: restrição do crescimento fetal, distúrbios vasculares placentários, infecção e inflamação intrauterina, anormalidades congênitas, descolamento prematuro da placenta, corioamnionite, asfixia no parto entre outros <sup>6</sup>.

Dentre as complicações associadas à paralisia cerebral, destaca-se a osteopenia, que é um termo usado para descrever a diminuição da densidade óssea que está abaixo dos níveis normais <sup>7</sup>. As crianças com paralisia cerebral grave estão mais propensas a apresentarem baixa densidade mineral óssea e fraturas por baixo impacto devido ao longo período de imobilização, aspectos nutricionais, estado puberal e uso crônico de anticonvulsivantes <sup>8</sup>. Dessa forma, torna-se evidente a necessidade de se realizar pesquisas no contexto de paralisia cerebral e seus distúrbios, a fim de se estabelecerem novas estratégias de intervenção para minimizar o impacto causado pela patologia em foco.

Nesse contexto, o kaempferol que é um flavonóide, pode ser encontrado em muitas plantas comestíveis, como por exemplo, brócolis, repolho, couve, feijão, escarola, alho-poró, tomate, morango e uva, e em plantas ou produtos botânicos comumente usados na medicina tradicional, por exemplo, Ginkgo biloba, Tilia spp, Equisetum spp, Moringa oleifera, Sophora japonica e própolis <sup>9</sup>.

De acordo com a literatura, o kaempferol tem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias das quais foram demonstradas em diversos modelos de doenças, dentre elas, a encefalomielite, diabetes, asma e carcinogênese <sup>10</sup>. Estudos constataram a eficácia do Kaempferol no tratamento de câncer de mama, esôfago, colo do útero, ovário, fígado e leucemia <sup>11</sup>. Outro estudo ainda elucidou que o kaempferol em concentrações variando de 0,1 a 100 microM, exercem efeitos redutores na reabsorção óssea dependendo do tempo e da dose <sup>12</sup>.

O Kaempferol, além disso, é reconhecido como potente agente anti-osteoclástico, devido à sua ação sobre osteoclastos e osteoblastos <sup>13</sup>. Adicionalmente, o kaempferol diminuiu a perda óssea e aumentou as células osteoprogenitoras num modelo de osteopenia, isto é, em ratos ovariectomizados <sup>14</sup>. Esses efeitos promissores, no entanto, ainda não foram analisados em doenças que promovem importantes modificações ósseas durante o desenvolvimento, como é o caso da PC. Neste contexto, é de suma importância a compreensão sobre os efeitos e propriedades do kaempferol visando a descoberta de novas estratégias terapêuticas. Assim, este estudo teve como objetivo analisar o papel do kaempferol nos parâmetros de desenvolvimento do tecido ósseo em ratos submetidos a um modelo de paralisia cerebral experimental.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Aspectos Éticos**

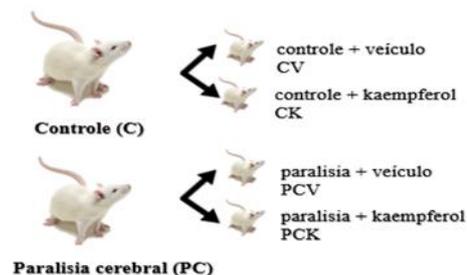
Este projeto aderiu às diretrizes do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, bem como as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Além disso, o projeto foi submetido à Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFPE, CEUA: N<sup>o</sup> 0063/2019.

## 2.2 Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados 32 ratos machos da linhagem Wistar, os quais foram mantidos no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. As condições de manutenção incluíam uma temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ciclo claro-escuro de 12/12 horas e livre acesso à água e alimentação padrão do biotério. Após a confirmação da gestação as fêmeas foram alojadas em gaiolas individuais.

Após o nascimento, os filhotes foram ajustados para um grupo de oito filhotes por ninhada, com peso variando entre 6-8 gramas no primeiro dia pós-natal, permanecendo com suas respectivas genitoras durante o período de lactação, e durante esse período foram distribuídos em quatro subgrupos: a) Controle Veículo (CV), b) Controle Kaempferol (CK), c) Paralisia Cerebral Veículo (PCV), d) Paralisia Cerebral Kaempferol (PCK). Após o desmame, que ocorreu no 25º dia pós-natal, os animais foram separados em gaiolas individuais (3-4 animais por gaiola) e permaneceram nessa configuração até os 36 dias de vida pós-natal, quando foram eutanasiados para coleta de tecidos.

**Figura 1.** Divisão dos grupos do modelo experimental.



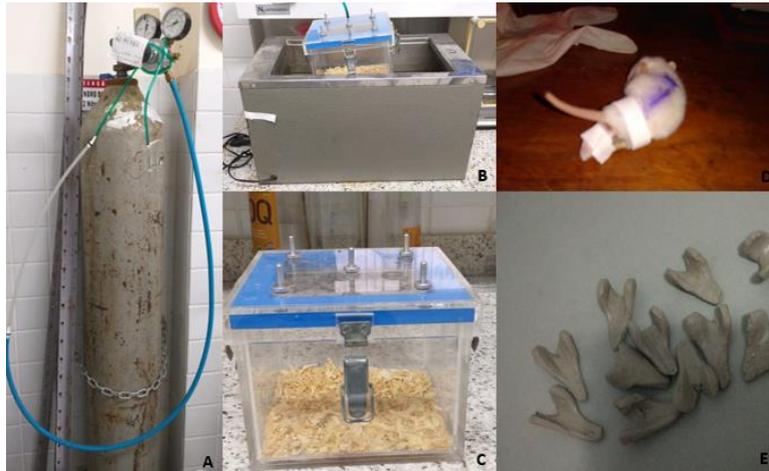
A formação dos grupos está de acordo com intervenção com Kaempferol ou veículo, bem como no modelo de paralisia cerebral ou no grupo de controle. CV (Controle + Veículo); CK (Controle + Kaempferol); PCV (Paralisia cerebral + Veículo,) e PCK (Paralisia Cerebral + Kaempferol).

### **2.3 Paralisia Cerebral Experimental**

Os filhotes dos grupos PCV e PCK foram submetidos ao modelo experimental de paralisia cerebral conforme descrito por SILVA <sup>15</sup>, STRATA <sup>16</sup> e COQ <sup>17</sup>. Este modelo associa a anoxia perinatal a um modelo de restrição sensório-motora dos membros inferiores que simula a falta de movimento observada na paralisia cerebral. Após o nascimento, os filhotes foram submetidos a dois episódios de anoxia, um no P0 e outro no P1. Entre os dias P2 e P28 foram submetidos a restrição sensório-motora durante 16 horas por dia.

O método de anoxia perinatal utiliza uma câmara em banho-maria a 37°C onde os animais são expostos a uma ventilação de nitrogênio por 12 minutos (N 100%, 9L/min). Do P2 ao P28 foi realizada a restrição sensório-motora das patas posteriores usando fita micropore, esparadrapo e molde feito de epóxi durante 16 horas por dia e nas 8 horas restantes, a livre movimentação do animal foi permitida <sup>15</sup>.

**Figura 2.** Materiais utilizados no protocolo de paralisia experimental.



A. Cilindro de Nitrogênio; B. Banho-maria; C. Câmara de anoxia, D. Animal imobilizado. E. Órteses.

## 2.4 Tratamento com Kaempferol

Os filhotes dos grupos CK e PCK receberam durante os primeiros 21 dias de vida pós-natal, o tratamento com kaempferol (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) foi aplicado 1 mg/Kg, com volume de aplicação de 1  $\mu$ l/g via intraperitoneal. DMSO (dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) foi utilizado para dissolver o kaempferol e preparar solução estoque obtida pela mistura de 50 mg de kaempferol e 5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) (m/v), alíquotas de 20  $\mu$ l que foram mantidas à  $-80^{\circ}\text{C}$  em tubos eppendorfs identificados e protegidos da luz. A injeção diária de Kaempferol foi aplicada em filhotes de ratos como uma suspensão recém-dissolvida na solução do veículo (0,1% v/v DMSO em solução salina) em uma dose de 1 mg/kg. Os filhotes dos grupos CV e CPV receberam a solução do veículo. O Kaempferol foi administrado diariamente entre 9 e 10 horas da manhã. A dose adotada foi a determinada por estudo anterior dos efeitos do tratamento neonatal <sup>18 19</sup>.

## **2.5 Eutanásia**

No dia pós-natal 36 (P36), os animais pertencentes aos diversos grupos experimentais foram sacrificados por meio de perfusão transcardíaca, e os ossos foram coletados para análises subsequentes.

## **2.6 Análises experimentais**

### **2.6.1 Aferição do peso e comprimento da tíbia:**

Após a dissecação, as tíbias foram imediatamente pesadas na balança de precisão (0,01 g). O comprimento total dos ossos da tíbia foi aferido utilizando um paquímetro digital (Jomarca ®) com uma precisão de 0,01 mm. Sobre superfície lisa com sua face ventral voltada para cima.

### **2.6.2 Análise histológica e histomorfométrica da tíbia:**

Os ossos da tíbia foram dissecados e fixados em solução de formol a 10% por dois dias e depois lavados em solução tampão de PBS, foram então incluídos em solução descalcificadora EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e depositadas em uma mesa agitadora por aproximadamente dois meses, quando constatada a descalcificação a solução foi descartada e os tecidos foram armazenados em álcool 70% até a realização do processamento histológico. Posteriormente as peças foram desidratadas com soluções crescentes de álcool 70%, diafanizadas em álcool xilol, depois xilol e incluídas em parafina. Foi realizada a análise histomorfométrica utilizando cortes transversais da diáfise da tíbia de cada animal (figura 3).

As lâminas foram coradas por Hematoxilina / Eosina (HE) e analisadas por microscopia de luz, nesses cortes, a espessura do osso cortical e área medular foi analisada por meio da aquisição de imagens das diáfises com aumento final de 40x onde foram efetuadas três em cada corte histológico na tíbia, priorizando as regiões superior, inferior e lateral de cada corte. Quanto a análise histológica (figura 3), foi realizada a aquisição de imagens conforme descrito acima da região da diáfise da tíbia para análise do número de lacunas de osteócitos por campo, área das células, que foram analisadas no aumento final de 400x utilizando-se o programa *ImageJ* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) adequadamente calibrado.

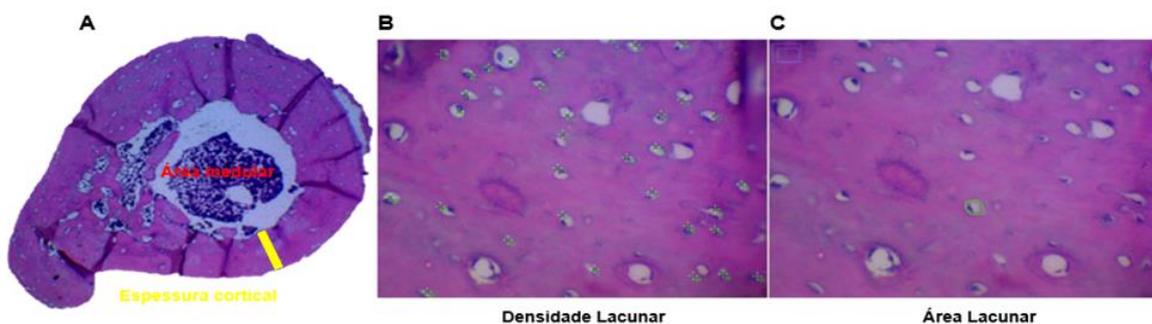


Figura 3: Fotomicrografia ilustrando em corte transversal regiões avaliadas do osso cortical da tíbia: (A) espessura cortical com a seta amarela e, área medular letras em vermelho em aumento final de 40x, (B) Densidade lacunar e (C) Área lacunar em aumento final de 400x.

### 2.6.3 Análise Estatística:

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. (erro padrão da média). A análise de normalidade da amostra foi realizada por meio do teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para os dados considerados paramétricos, a comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste *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 7*® (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA*) e o nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

Em relação à morfologia macroscópica, primeiramente sobre o peso da tíbia houve diferenças entre os grupos [ $F(3,21) = 11.18$ ;  $p = 0.0001$ ]. O grupo PCV apresentou menor peso da tíbia quando comparado ao grupo CV ( $p = 0.0005$ ). O grupo PCK também apresentou peso da tíbia menor quando comparado ao CK ( $p = 0.0241$ ). Não houve diferenças entre os grupos PCV vs. PCK ( $p = 0.6675$ ) e CV vs. CK ( $p = 0.9365$ ) [Tabela 1].

Sobre o comprimento da tíbia, houve diferenças entre os grupos [ $F(3,21) = 19.38$ ;  $p < 0.0001$ ]. O grupo PCV apresentou comprimento menor comparado ao grupo CV ( $p < 0.0001$ ), assim como o grupo PCK apresentou menor comprimento absoluto comparado ao CK ( $p = 0.0003$ ). Não houve diferenças entre os grupos PCV vs. PCK ( $p = 0.9848$ ) e CV vs. CK ( $p = 0.9951$ ) [Tabela 1].

Tabela 1. Medidas macroscópicas da tíbia P36.

Medidas (P36)	Grupos			
	CV	CK	PCV	PCK
Peso (g)	$0,3368 \pm 0,0172^*$	$0,3223 \pm 0,0093^{**}$	$0,2158 \pm 0,0158$	$0,2443 \pm 0,0232$

Comprimento (mm)	26.75± 0.4071*	26.53±0.4748**	21.55± 0.7307	21.87±0.8632
------------------	----------------	----------------	---------------	--------------

Tabela 1. Medidas absolutas do peso e do comprimento da tíbia. A composição dos grupos está de acordo com a intervenção com Kaempferol ou veículo e o modelo de paralisia cerebral ou controle. CV (Controle + Veículo); CK (Controle + Kaempferol); CPV (Paralisia Cerebral + Veículo); CPK (Paralisia Cerebral + Kaempferol) N por grupo: 8. Os dados são apresentados em média e erro padrão da média e foram analisados pela *two-way ANOVA test*, seguida pelo *post hoc Tukey test*. \*= diferenças entre PCV e CV; \*\*= diferenças entre PCK e CK.

Em relação à análise da morfologia microscópica, primeiramente em relação a espessura cortical, houve diferenças entre os grupos [F (3, 12) = 13.60; P=0.0004]. O grupo PCV apresentou menor espessura cortical comparado ao CV (PCV= 260,5 ± 17,98 µm vs. CV= 351,5 ± 12,09 µm; p=0.0043). O grupo PCK também apresentou menor espessura cortical quando comparado ao CK (PCK= 262,3 ± 11,85 µm vs. CK= 359,0 ±10,28 µm; p= 0.0027). Não houve diferenças entre os grupos PCV vs. PCK (p= 0.9997) e CV vs. CK (p=0.9832) [Figura 2A].

Em relação à análise da área medular da tíbia houve diferenças entre os grupos [F (3, 12) = 16.64; P=0.0001]. O grupo PCV apresentou menor área medular quando comparado ao grupo CV (PCV= 407932 ± 43753 µm<sup>2</sup> vs. CV= 595779 ± 32670 µm<sup>2</sup>; p= 0.0010). O grupo PCK também apresentou área medular menor quando comparado ao grupo CK (PCK= 487911 ± 57882 µm<sup>2</sup> vs. CK= 635740 ±35765 µm<sup>2</sup>; p=0.0067). Não houve diferenças entre os grupos PCV vs. PCK (p= 0.1708) e CV vs. CK (p=0.6887) [Figura 2B].

Em relação a análise da área lacunar houve diferenças entre os grupos [Kruskal-Wallis statistic 121,3;  $P < 0.0001$ ]. O grupo PCV apresentou menor área de lacunas de osteócitos comparado ao CV (PCV=  $38,98 \pm 0,5471 \mu\text{m}^2$  vs. CV=  $45,23 \pm 0,6354 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0.0001$ ). O grupo PCK também apresentou menor área de lacunas quando comparado ao CK (PCK=  $39,56 \pm 0,5945$  vs. CK=  $46,68 \pm 0,6355$ ,  $p < 0.0001$ ). Não houve diferenças entre os grupos PCV vs. PCK ( $p > 0.9999$ ) e CV vs. CK ( $p = 0.5244$ ) [Figura 2C].

Em relação a densidade de lacunas de osteócitos houve diferenças apenas entre os grupos PCV vs. PCK [Kruskal-Wallis statistic 14,83;  $P = 0.0020$ ] (PCV=  $27,06 \pm 1,036 \text{ n/mm}^2$  vs. PCK=  $32,99 \pm 1,220 \text{ n/mm}^2$ ;  $p = 0.0010$ ) [Figura 2D].

Figura 2. Morfometria microscópica da tíbia.

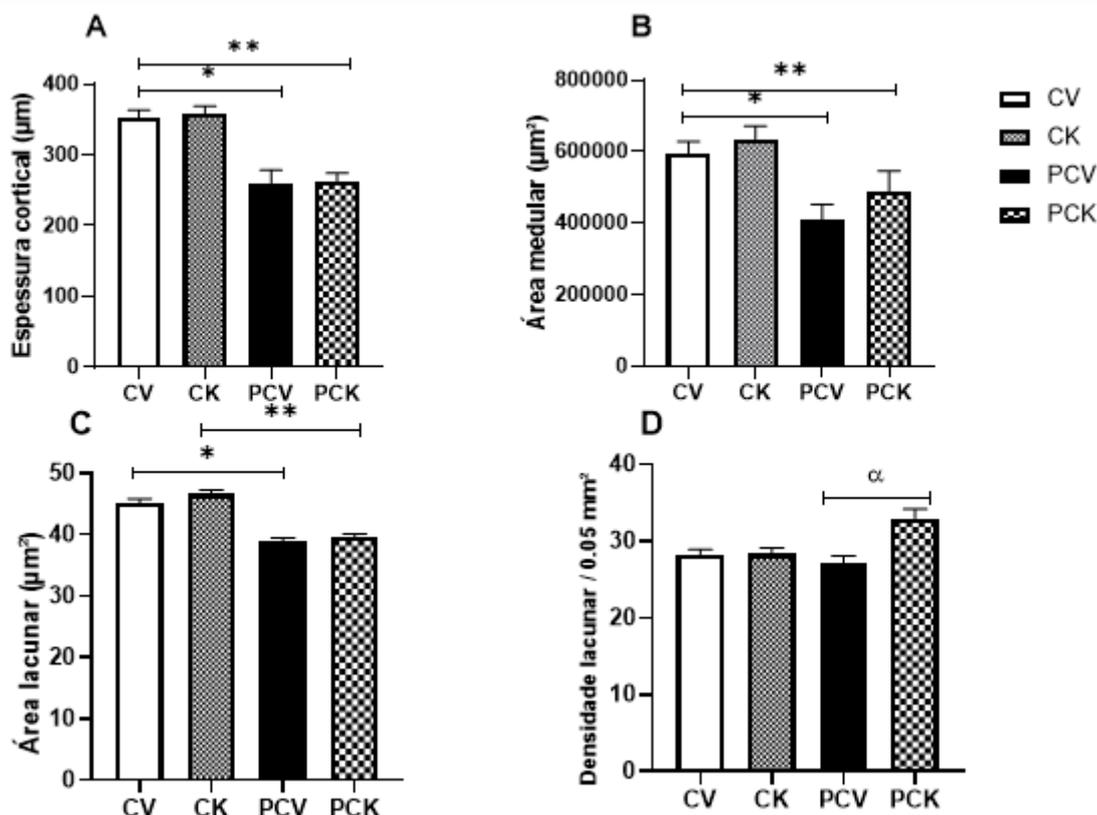


Figura 2: MORFOMETRIA MICROSCÓPICA DA TÍBIA: (A) Espessura cortical, (B) Área medular, (C) Área lacunar, (D) Densidade lacunar. A composição dos grupos está de acordo com a intervenção com Kaempferol ou veículo e o modelo de paralisia cerebral ou controle. CV (Controle + Veículo); CK (Controle + Kaempferol); CPV (Paralisia Cerebral + Veículo); CPK (Paralisia Cerebral + Kaempferol) N por grupo: 5. Os dados são apresentados em média e erro padrão da média e foram analisados pela *two-way ANOVA test*, seguida pelo *post hoc Tukey test*. \*= diferenças entre PCV e CV; \*\*= diferenças entre PCK e CK; α= diferenças entre PCV e PCK.

## 4 DISCUSSÃO

Até onde sabemos, não há registros de estudos que tenham investigado os efeitos do kaempferol na paralisia cerebral em relação aos parâmetros ósseos. Nossos resultados, obtidos na avaliação dos animais no dia pós-natal 36 (P36), revelaram que a indução experimental da paralisia cerebral resultou em diversas alterações significativas nos ossos, incluindo a redução do peso absoluto e do comprimento absoluto da tíbia, bem como a diminuição da espessura cortical, área medular e área das lacunas ósseas. O tratamento com kaempferol, por sua vez, teve efeitos no tecido ósseo, especificamente no parâmetro de densidade lacunar de osteócitos.

Em um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, usando o mesmo modelo de paralisia cerebral, identificaram várias alterações nos animais, incluindo deficiência de mastigação, ingestão de alimentos nas primeiras semanas de vida pós-natal, além da diminuição dos movimentos da mastigação, redução na sensibilidade intra-oral e redução do peso e da proporção das fibras tipo IIB no músculo masseter <sup>20</sup>. Em um estudo prévio observou-se que a exposição neonatal ao kaempferol atenuou no mesmo modelo de

paralisia cerebral os danos referentes ao desenvolvimento da locomoção e sistema neuromotor, na marcha e ainda reduziu o impacto da PC sobre o peso e a área de fibras do tipo I do músculo sóleo <sup>21</sup>.

A diminuição dos parâmetros histomorfométricos ósseos é comum em estudos utilizando modelos de imobilização dos membros em que os ratos que apresentam uma diminuição no desenvolvimento do tecido ósseo e alteração na massa óssea, que pode ser associado a perda de conteúdo de cálcio e outros minerais, ocasionada pela imobilização <sup>22</sup>. De forma semelhante em um estudo realizado em humanos por WonjinKim e colaboradores <sup>23</sup>, foi avaliado a densidade mineral óssea de adultos com paralisia cerebral, no qual demonstrou que a redução da sustentação de peso e a imobilidade relacionadas à PC causam um equilíbrio ósseo negativo devido ao aumento da reabsorção óssea, o que leva a uma menor massa óssea.

Quanto aos dados histológicos, pôde-se observar resultados relevantes quando comparamos os animais PCP vs. PCK, observa-se que o tratamento com o kaempferol levou a um aumento do número de lacunas de osteócitos, indicando que o processo de diferenciação celular foi alterado de forma positiva a partir do tratamento, o que demonstra o potencial do mesmo no processo de formação óssea e prevenção do fenótipo ósseo alterado <sup>24, 12</sup>.

## **5 CONCLUSÃO**

Avaliamos o papel terapêutico do flavonoide kaempferol na redução dos déficits ósseos em um modelo experimental de paralisia cerebral (PC), nossos resultados corroboram a ideia de que o modelo

induz danos associados comumente a PC, como e também alterações ósseas na tíbia como como a redução do peso absoluto e comprimento absoluto, redução da espessura cortical e da área medular, e que o tratamento com Kaempferol foi capaz de atenuar os efeitos histologicamente, onde foi possível observar o aumento do número de lacunas. São necessários mais estudos para ampliar a compreensão acerca do uso do kaempferol e seu papel no desenvolvimento do tecido ósseo.

## REFERÊNCIAS

- <sup>1</sup> SADOWSKA, M.; SARECKA-HUJAR, B.; KOPYTA, I. Cerebral Palsy: Current Opinions on Definition, Epidemiology, Risk Factors, Classification and Treatment Options. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. Volume 16, n. 16, p. 1505–1518, jun. 2020. <https://doi.org/10.2147/NDT.S235165>
- <sup>2</sup> BAX, Martin et al. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Developmental medicine and child neurology*, v. 47, n. 8, p. 571-576, 2005. <https://doi.org/10.1017/S001216220500112X>
- <sup>3</sup> ROSENBAUM, P. et al. A Report: The Definition and Classification of Cerebral Palsy April 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17370477/>>. [PMID: 17370477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17370477/)
- <sup>4</sup> MANCINI, M. C. et al. Comparação do desempenho de atividades funcionais em crianças com desenvolvimento normal e crianças com paralisia cerebral. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 60, p. 446–452, 1 jun. 2002. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2002000300020>
- <sup>5</sup> MCINTYRE, S. et al. Global prevalence of cerebral palsy: A systematic analysis. *Developmental Medicine & Child Neurology*, v. 64, n. 12, 11 ago. 2022. <https://doi.org/10.1111/dmcn.15346>
- <sup>6</sup> STAVSKY, M. et al. Cerebral Palsy—Trends in Epidemiology and Recent Development in Prenatal Mechanisms of Disease, Treatment, and Prevention. *Frontiers in Pediatrics*, v. 5, 13 fev. 2017. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00021>
- <sup>7</sup> KARAGUZEL, G.; HOLICK, M. F. Diagnosis and treatment of osteopenia. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 11, n. 4, p. 237–251, dez. 2010. <https://doi.org/10.1007/s11154-010-9154-0>.

- <sup>8</sup> SCHEINBERG, M. A. et al. Bone health in cerebral palsy and introduction of a novel therapy. *Einstein (São Paulo)*, v. 13, n. 4, p. 555–559, dez. 2015. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015A03321>
- <sup>9</sup> M. CALDERON-MONTANO, J. et al. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 4, p. 298–344, 1 abr. 2011. <https://doi.org/10.2174/138955711795305335>
- <sup>10</sup> RAJENDRAN, P. et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 86, p. 103–112, out. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.011>
- <sup>11</sup> SIMUNKOVA, M. et al. Antioxidant vs. Prooxidant Properties of the Flavonoid, Kaempferol, in the Presence of Cu(II) Ions: A ROS-Scavenging Activity, Fenton Reaction and DNA Damage Study. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 4, p. 1619, 5 fev. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22041619>
- <sup>12</sup> PROUILLET, Christophe et al. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochemical Pharmacology*, v. 67, n. 7, p. 1307-1313, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.11.009>
- <sup>13</sup> YANG, Li et al. Kaempferol stimulates bone sialoprotein gene transcription and new bone formation. *Journal of cellular biochemistry*, v. 110, n. 6, p. 1342-1355, 2010. <https://doi.org/10.1002/jcb.22649>
- <sup>14</sup> TRIVEDI, Ritu et al. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague–Dawley rats. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 289, n. 1-2, p. 85- 93, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.02.027>
- <sup>15</sup> SILVA, K.O.G. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.05.002>
- <sup>16</sup> 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.024>
- <sup>17</sup> COQ, Jacques-Olivier e colab. 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, Mar 2008. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.006>
- <sup>18</sup> LAGOA R, Lopez-Sanchez C, Samhan-Arias AK, Gañan CM, Virginio Garcia-Martinez, Gutierrez-Merino C. Kaempferol protects against rat striatal degeneration induced by 3-

nitropropionic acid. *Journal of Neurochemistry*. 2009 Sep 23;111(2):473–87. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06331.x>

<sup>19</sup> Diego Bulcão Visco, Manhães R, Maria M, Santana, Henrique, Laura M, et al. Neonatal kaempferol exposure attenuates gait and strength deficits and prevents altered muscle phenotype in a rat model of cerebral palsy. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2022 Nov 20;83(1):80–97. <https://doi.org/10.1002/JDN.10239>

<sup>20</sup> LACERDA, DC e colab. Treatment with the essential amino acid L-tryptophan reduces masticatory impairments in experimental cerebral palsy. *Nutr Neurosci*. 2019. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1695360>

<sup>21</sup> DIEGO BULCÃO VISCO et al. Neonatal kaempferol exposure attenuates impact of cerebral palsy model on neuromotor development, cell proliferation, microglia activation, and antioxidant enzyme expression in the hippocampus of rats. *Nutritional Neuroscience*, p. 1–22, 28 dez. 2022. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2022.2156034>

<sup>22</sup> TUUKKANEN, J. et al. Changes induced in growing rat bone by immobilization and remobilization. *Bone*, v. 12, n. 2, p. 113-118, 1991. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(91\)90009-8](https://doi.org/10.1016/8756-3282(91)90009-8)

<sup>23</sup> KIM, W. et al. Adults with spastic cerebral palsy have lower bone mass than those with dyskinetic cerebral palsy. *Bone*, v. 71, p. 89–93, fev. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.10.003>

<sup>24</sup> NOVAK, Iona et al. Early, accurate diagnosis and early intervention in cerebral palsy: advances in diagnosis and treatment. *JAMA pediatrics*, v. 171, n. 9, p. 897-907, 2017. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.1689>

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



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

Recife, 08 de outubro de 2019

Ofício nº 75/19

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

Para: **Prof. Ana Elisa Toscano da Silva Castro**

Centro Acadêmico de Vitória

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **0063/2019**

Certificamos que a proposta intitulada “**Plasticidade fenotípica: efeitos do tratamento neonatal com kaempferol sobre parâmetros morfológicos e moleculares ósseos em modelo experimental de paralisia cerebral.**”, registrado com o nº **0063/2019** 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 24/09/2019

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/10/2019 a 15/02/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	65
Peso/Idade	Adultos(90d ±300g) e Neonatos
Sexo	Macho 53( adultos 5, neonatos 48 Fêmeas nulíparas 12 ( adultos)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério de experimentação do Departamento de Nutrição da UFPE.

Atenciosamente,



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

## **ANEXO B – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA**

- INSTRUÇÕES PARA OS AUTORES

O manuscrito deve ser enviado em DOIS arquivos:

1. Página de Rosto - com as informações dos autores (graduação, título mais alto, instituição, email), instituição e autor correspondente;
2. Texto - título (portugues, ingles e espanhol), resumo e descritores (portugues, ingles e espanhol), artigo completo, figuras e tabelas ao final.

Os arquivos deverão ser enviados no formato do Microsoft Office Word, com configuração obrigatória das páginas em papel A4 (210 × 297 mm) e margens de 2 cm em todos os lados, fonte Verdana tamanho 14 e espaçamento de 1,5 pt entre linhas.

- Título e Autoria:

O título deve estar em inglês, português e espanhol e ser conciso e informativo, com até 80 caracteres. Devem ser listados no máximo dez (10) autores e seus nomes completos bem como as responsabilidades de cada um devem seguir os critérios de autoria do ICMJE (informações abaixo). A afiliação de cada autor deve conter as informações: universidade, departamento, cidade, país e ORCID (todos os autores devem ter o identificador ORCID – Open Researcher and Contributor ID – <https://orcid.org/signin>).

O autor correspondente deve ser o professor/orientador responsável institucional pelo trabalho, e fornecer endereço completo e email.

- Responsabilidade dos Autores: é obrigatório que cada autor ateste ter participado suficientemente do trabalho para assumir a responsabilidade por uma parcela significativa do conteúdo do manuscrito. Cada um dos autores deve especificar suas contribuições para o trabalho. O autor correspondente ou autor que encaminhou o trabalho indicará, durante o processo de submissão, a garantia e a exatidão da integridade de todos os dados relatados no manuscrito.

A Revista Neurociências recomenda que a autoria se baseie nos quatro critérios descritos a seguir:

Contribuições substanciais para concepção ou desenho da obra; ou aquisição, análise ou interpretação dos dados para o trabalho; ou elaboração do trabalho ou revisão crítica de importante conteúdo intelectual; ou aprovação final da versão a ser publicada; ou Consentimento em ser responsável por todos os aspectos do trabalho, garantindo que as questões relacionadas à precisão ou à integridade de qualquer parte do trabalho sejam devidamente investigadas e resolvidas.

Todos os colaboradores que não atendam aos critérios de autoria devem ser listados na seção Agradecimentos, bem como o apoio financeiro das agências de fomento.

- Artigo Original e Revisão Sistemática: resultado de pesquisa de natureza empírica, experimental ou conceitual (6000 palavras).
- Título: em português, inglês e espanhol, sintético e restrito ao conteúdo, contendo informação suficiente para catalogação, não excedendo 90 caracteres. A Revista prefere títulos informativos.
- Autor(es): referir nome(es) e sobrenome(s) por extenso. Referir a instituição em que foi feita a pesquisa que deu origem ao artigo. Referir formação acadêmica, titulação máxima e vínculo profissional mais importante de cada autor, por ex.: 1- Neurologista, Livre Docente, Professor Adjunto da UNIFESP, 2- Neurologista, Pós-graduando na UNICAMP, 3- Neurologista, Residente no Hospital São Paulo - UNIFESP. Referir suporte financeiro. A ordem dos autores deve seguir a orientação de Vancouver: primeiro autor o que realizou o projeto, último autor o orientador. O orientador ou professor da instituição deve ser indicado como autor correspondente.

- Resumo (português, inglês e espanhol): devem permitir uma visão panorâmica do trabalho. O resumo deve ser estruturado em objetivos, métodos, resultados e conclusões. Não exceder 250 palavras.  
Unitermos (português, inglês e espanhol): Máximo de 6 (seis). Como guia, consulte descritores em ciências da saúde (<http://decs.bvs.br>).
- Corpo do Artigo: apresentar a matéria do artigo seqüencialmente: introdução e objetivo; método (sujeitos ou relato de caso, número do protocolo do Comitê de Ética da Instituição, procedimento ou intervenção e análise estatística) com detalhes suficientes para a pesquisa poder ser duplicada, resultados (apresentados de forma clara e concisa), discussão (interpretação dos resultados comparados à literatura), conclusões, agradecimentos, referências bibliográficas. As abreviações devem vir acompanhadas do seu significado na primeira vez que aparecerem no texto. Nomes comerciais e marcas registradas devem ser utilizados com parcimônia, devendo-se dar preferência aos nomes genéricos. Agradecimentos: Devem ser feitos a pessoas ou Instituição que auxiliou diretamente a pesquisa, mas que não cabem como autores do trabalho. Figuras, Quadros, Gráficos e Tabelas: Juntos não poderão exceder 5. Deverão ser apresentados em páginas separadas e no final do texto. Em cada um, deve constar seu número de ordem, título e legenda. As figuras e gráficos devem ter tamanho não superior a 6cm x 9cm, com alta resolução (300) e em arquivo JPEG. Identificar cada ilustração com seu número de ordem e legenda. Ilustrações reproduzidas de textos já publicados devem ser acompanhadas de autorização de reprodução, tanto do autor como da publicadora.