

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**NEUROCIÊNCIAS**

**Efeito do enriquecimento ambiental nas alterações motoras de ratos  
submetidos à hipóxia-isquemia neonatal**

Rafael Goldani

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação como  
requisito parcial para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Biológicas: Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lenir Orlandi Pereira Silva

**Porto Alegre**

**2010**

Dedico este trabalho ao meu pai Gerci, minha mãe Lourdes,  
minha irmã Letícia e minha namorada Sol.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao Prof. Alex pela oportunidade e confiança depositadas. É um exemplo de professor, orientador, pesquisador e amigo, com o qual aprendi muito. Sou grato por tudo e saiba que teve uma importância fundamental na minha formação profissional e pessoal. Muito obrigado.

Aos amigos do Lab. 35 (Bioquímica), sou muito grato pelos bons momentos trabalhando, pesquisando, estudando, e sempre se divertindo. Em especial a Profa. Lenir que teve papel fundamental na realização deste trabalho. A sua dedicação, ética, organização e empenho são exemplos que levarei para a vida.

E, como todos precisamos de um “porto seguro”, agradeço aos meus pais, Gerci e Lourdes, pelo carinho, pelo amor, pela educação, pelos princípios e pelos conselhos sempre sábios. Sou um eterno admirador e seguidor dos seus passos e podem ter certeza que o meu sucesso se deve ao sucesso de vocês. Amo vocês.

Minha Irmã, pelas longas conversas sobre a vida e pela paciência nos momentos mais críticos. Meus dois “irmãos” Gui e Rodrigo, que são muito importantes para lembrarmos que os verdadeiros amigos são os “pilares” da vida. Valeu pelos conselhos e pelos incentivos durante todos estes anos.

Agradeço em especial a minha noiva Solange Manica pela compreensão, pela dedicação, pela paciência e pelo amor incondicional dedicados durante estes anos. És um anjo que me dá força, motivação e enche minha vida de alegria. Te amo!

E por fim, aos meus pacientes que têm fundamental importância por representarem a ligação entre a pesquisa básica e a clínica. Obrigado pela compreensão, incentivo e confiança.

### **Lista de Abreviaturas**

AE: ambiente enriquecido

AMPA: ácido a-amino-3hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

ANOVA: análise de variância

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

CT-AP: controle- ambiente padrão

CT-AE: controle – ambiente enriquecido

DPN: dias pós-natal

EP: erro padrão

HIE: hipóxia isquemia encefálica

HI-AP: hipóxia isquemia – ambiente padrão

HI-AE: hipóxia isquemia – ambiente enriquecido

NMDA: N-metil-D-aspartato

PBS: salina tamponada com fosfato (“phosphat buffer saline”)

pH: potencial hidrogeniônico

PI3-K: fosfatidil inositol 3-quinase

SNC: sistema nervoso central

SOD: superóxido desmutase

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Desenho ilustrativo do procedimento de hipóxia isquemia neonatal.
- Figura 2:** Foto ilustrativa do aparelho ROTA ROD.
- Figura 3.** A. Desenho ilustrativo da Escada Horizontal.
- Figura 4:** Foto ilustrativa do Teste de Suspensão.
- Figura 5.** Linha do tempo representativa do experimento 1.
- Figura 6.** Linha do tempo representativa do Experimento 2.
- Figura 7:** Tempo de suspensão na barra dos machos (22DPN).
- Figura 8:** Deslocamento na barra dos machos (22DPN).
- Figura 9:** Tempo de suspensão na barra das fêmeas (22DPN)
- Figura 10:** Deslocamento na barra das fêmeas (22DPN)
- Figura 11:** Latência de queda dos machos no teste *Rota Rod* (22DPN)
- Figura 12:** Latência da queda das fêmeas no teste *Rota Rod* (22DPN)
- Figura 13:** Tempo de suspensão na barra dos machos do grupo 42DPN
- Figura 14:** Deslocamento na barra dos machos do grupo 42DPN.
- Figura 15:** Tempo suspensão na barra das fêmeas com 42DPN
- Figura 16:** Deslocamento na barra das fêmeas com 42DPN
- Figura 17:** Latência de queda dos machos no teste *Rota-Rod* (42DPN).
- Figura 18:** Latência de queda das fêmeas no teste *Rota-Rod*. (42DPN)
- Figura 19:** Tempo de suspensão dos machos na barra
- Figura 20:** Deslocamento dos machos na barra.
- Figura 21:** Tempo suspenso das fêmeas na barra
- Figura 22:** Deslocamento das fêmeas na barra.
- Figura 23:** Latência de queda dos machos do Rota Rod
- Figura 24:** Latência de queda das fêmeas do Rota Rod
- Figura 25:** Soma do número de erros das patas anterior e posterior esquerda em machos no teste da Escada Horizontal

**Figura 26:** Soma do número de erros das patas anterior e posterior direita em machos no teste da Escada Horizontal

**Figura 27:** Soma do número de erros das patas anterior e posterior esquerda em fêmeas no teste da Escada Horizontal

**Figura 28:** Soma do número de erros das patas anterior e posterior direita em fêmeas no teste da Escada Horizontal

**Figura 29:** Volume hipocampal direito e esquerdo.

**Figura 30.** Área estriatal direita e esquerda.

## RESUMO

A encefalopatia hipóxico-isquêmica neonatal é a causa mais importante de dano cerebral que ocorre no período de desenvolvimento e maturação causando à criança sequelas neurológicas de grande impacto ao longo da vida. O ambiente é um importante aliado no processo de reabilitação neuropediátrica, sendo muito utilizado pelos profissionais da saúde. Estímulos ambientais podem servir como estratégia de tratamento e inúmeros estudos têm demonstrado o seu potencial neuroprotetor. Este trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento motor em dois momentos do desenvolvimento e os possíveis benefícios do enriquecimento ambiental em ratos submetidos à hipóxia-isquemia cerebral neonatal. Ratos Wistar machos e fêmeas foram submetidos a um modelo de lesão hipóxico-isquêmica encefálica neonatal no 7º dia pós-natal. Em um primeiro momento, foram avaliados com 22 dias e 42 dias de vida, e num segundo momento, foram submetidos a um protocolo de enriquecimento ambiental que iniciava no 8º dia de vida. Para avaliação do comportamento motor foi utilizado o teste de suspensão na barra, teste rota Rod e teste da caminhada na escada horizontal. Os animais não apresentaram alterações sensoriomotoras com 22 dias de vida, porém com 42 dias as alterações foram significativas. O enriquecimento ambiental promoveu uma recuperação parcial dos déficits motores em ratos machos quanto à latência de queda no teste da barra e no Rota Rod. As fêmeas demonstraram um melhor aproveitamento do ambiente enriquecido que lhes proporcionou uma melhor performance no teste da caminhada e uma curva de aprendizado no teste Rota Rod. Quanto à morfologia, o enriquecimento ambiental não foi capaz de promover modificações significativas no dano hipocampal e estriatal. Com

base nos nossos resultados, podemos concluir que tanto animais com 22 DPN como com 42 DPN apresentaram alterações sensoriomotoras promovidas pela HIE neonatal e são influenciadas pelo gênero. O enriquecimento ambiental teve efeito neuroprotetor, melhorando o desempenho motor sem alterações morfológicas significativas.

## ABSTRACT

The neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy is the most important cause of brain damage that occurs during development and maturation, causing neurological damage to the child with a big impact throughout the life. The environment is important in the process of neuropsychiatric rehabilitation and is widely used by health professionals. Enriched environment serve as a treatment strategy and several studies have demonstrated its effects neuroprotective. This study aimed to evaluate motor behavior in two stages of development and the possible benefits of environmental enrichment in rats with neonatal cerebral hypoxia-ischemia. Male and female Wistar rats were subjected to a model of hypoxic-ischemic neonatal brain at the 7th postnatal day. At first, were evaluated 22 days and 42 days of life, and subsequently, underwent a protocol of environmental enrichment that began on the 8th day of life. For evaluation of motor behavior test was used to Grip Test, Rota Rod test and ladder walking test. The animals no showed sensorimotor disturbance with 22 days of life but with 42 days the changes were significant. Environmental enrichment promoted a partial recovery of motor deficits in male rats on the latency to fall in the Grip test and the Rota Rod test. The females showed a better application of the enriched environment that gave them a better performance in the ladder walking test and a learning curve in Rota Rod test. As to morphology, environmental enrichment did not cause significant changes in striatal and hippocampal damage. Based on our results, we conclude that changes in sensorimotor function sponsored by HIE is progressive and influenced by gender. Environmental enrichment had a neuroprotective effect, improving motor performance, without significant morphological changes.

# SUMÁRIO

Abreviaturas.....	IV
Lista de Figuras.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1. Hipóxia isquemia encefálica.....	14
1.2. Enriquecimento Ambiental.....	18
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
2.2.1. Experimento 1.....	21
2.2.2. Experimento 2.....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 Animais.....	22
3.2 Hipóxia isquemia.....	22
3.3 Ambiente Enriquecido.....	23
3.4. Análise Comportamental.....	24
3.4.1 Teste Rota Rod.....	24
3.4.2 Teste Escada Horizontal.....	25
3.4.3 Teste Suspensão na Barra.....	26
3.5 Coleta e preparação da amostra.....	27
3.5.1 Volume do Hipocampo.....	28
3.5.2 Área do estriado.....	28
3.6. Desenho Experimental.....	29
3.6.1 Experimento 1.....	29
3.6.2 Experimento 2.....	30
3.7. Análise Estatística.....	32
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Resultados do Experimento 1.....	33

4.1.1 Grupo 22DPN.....	33
4.1.1.1 Teste Suspensão.....	33
4.1.1.2 Teste Rota Rod.....	36
4.1.2 Grupo 42DPN.....	37
4.1.2.1 Teste Suspensão.....	37
4.1.2.1 Teste Rota Rod.....	40
4.2 Resultados Experimento 2.....	41
4.2.1 Teste Suspensão.....	41
4.2.2 Teste Rota Rod.....	44
4.2.3 Teste Escada Horizontal.....	46
4.2.4 Volume da Lesão.....	50
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
5.1. Evolução do comportamento motor em animais submetidos à HIE.....	53
5.2. Efeito do Enriquecimento Ambiental.....	62
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) ocorre em fases, de acordo com uma seqüência pré-determinada para o desenvolvimento de cada região em particular. Nos seres humanos, a fase de maturação cerebral começa no primeiro trimestre gestacional e se estende até os primeiros anos de vida (CARAM et al., 2006).

Por possuir um sistema nervoso imaturo e em desenvolvimento, o neonato responde de forma distinta do adulto às lesões cerebrais, o que sugere que neurônios imaturos são mais suscetíveis pelo fato de estarem em constante desenvolvimento e necessitarem de maior aporte energético assim como maior número de capilares para tal (YAGER et al., 2004; MCLEAN e FERRIERO, 2004). Portanto, a gravidade das lesões está diretamente relacionada com a idade gestacional, tempo de duração e severidade, alterando a neurogênese, migração, mielinização, sinaptogênese e a morte celular (AYLWARD et al., 2005).

Este período inicial é tido como crítico, pois a janela do desenvolvimento ocorre somente uma vez e não pode ser revista ou repetida. Diversos fatores podem incidir negativamente sobre o desenvolvimento neuropsicomotor da criança, aumentando a probabilidade de alterações na aquisição de habilidades motoras, cognitivas e psicossociais (HALLAL, MARQUES, BRACCIALLI; 2008).

A lesão hipóxico-isquêmica encefálica neonatal (HIE) é uma das mais graves e limitantes complicações que afetam o recém nascido (WANG et al., 2002). É definida como uma encefalopatia crônica da infância, com um grupo heterogêneo de desordens, com predominante sintomatologia motora de

movimento e postura, atribuídas a distúrbios não progressivos que ocorrem pré, peri ou pós-natal afetando o sistema nervoso central em fase de maturação estrutural e funcional (JOHNSTON e HONN, 2006). O dano neurológico é permanente na forma de paralisia cerebral, com ou sem retardo mental, epilepsia e dificuldades no aprendizado (SHENG et al., 2006).

Little, em 1843, descreveu pela primeira vez a encefalopatia crônica da infância, e a definiu como patologia ligada a diferentes causas e caracterizada, principalmente, por rigidez muscular. Freud, em 1897, sugeriu a expressão paralisia cerebral (PC), que foi refinada por Phelps em 1950, ao se referir a um grupo de crianças que apresentavam transtornos motores mais ou menos severos devido à lesão do sistema nervoso central (ROTTA; 2002).

A prevalência dessa desordem é de 2 em cada 1000 crianças nascidas vivas em países desenvolvidos, podendo ser maior em prematuros e chegando a mais de 10% em crianças com baixo peso ao nascimento (menos de 1500gr) (LONGO e HANKINS; 2009). No Brasil, estima-se em cerca de 17.000 novos casos de paralisia cerebral por ano (EDELMUTH, 1992).

A etiologia da paralisia cerebral ocorre principalmente nos períodos pré- e perinatal. No período *pré-natal*, os principais fatores são infecções e parasitoses (rubéola, toxoplasmose, citomegalovírus, HIV), intoxicações (drogas, álcool, tabaco), radiações (diagnósticas ou terapêuticas), traumatismos (direto no abdome ou queda sentada da gestante) e fatores maternos (doenças crônicas, anemia grave, desnutrição, mãe idosa). No período *perinatal*, a asfixia é a principal causa, tanto a aguda (problemas no momento do parto) como a asfixia crônica (que está intimamente ligada a insuficiência placentária). No período *pós-natal*, que representa 10% dos

casos, os traumas e quedas são os principais agentes causais (JOHNSTON e HONN, 2006).

O perfil epidemiológico heterogêneo proporciona um quadro clínico variável. A paralisia cerebral pode ser classificada de diferentes formas, levando em consideração o momento da lesão, o local da lesão, a etiologia, a sintomatologia ou a distribuição topográfica. As mais utilizadas enfatizam os aspectos motores e são baseadas em aspectos anatômico-clínicos correlacionando com o comprometimento topográfico. São classificadas em espástica, coreoatetose, atáxica ou mista (UMPHRED, 2004) que conforme a topografia do comprometimento, podem ser hemiplégicas, diplégicas ou quadriplégicas (JOHNSTON e HONN, 2006).

Para a assistência deste quadro clínico variável, a equipe de reabilitação, em especial a fisioterapia, tem por objetivo modificar os padrões de tônus postural anormal e facilitar os padrões motores mais normais. Isto permitirá uma maior estabilidade postural, uma maior liberdade de movimentação para que a exploração do ambiente possa proporcionar o aprendizado de novas habilidades motoras.

### **1.1. Hipóxia-isquemia encefálica**

O funcionamento adequado das células neuronais depende da oferta apropriada de oxigênio e glicose para a produção de energia. Os mecanismos de despolarização e repolarização neuronal são extremamente dependentes de energia e constituem a base para o funcionamento cerebral.

A lesão hipóxico-isquêmica encefálica (HIE) causa um dano primário devido à privação de glicose e oxigênio, e a reperfusão e reoxigenação levam a

perda celular secundária pelo mecanismo de estresse oxidativo (AMATO e DONATI et al., 2000).

Em condições fisiológicas, com o funcionamento normal da mitocôndria, mais de 80% do oxigênio é reduzido para a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) pela citocromo oxidase. O restante é convertido em ânions superóxidos que irão ser reduzidos a água por mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Em situações de baixo aporte de oxigênio no microambiente celular, há inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e consequente acúmulo de espécies reativas de oxigênio (MCLEAN e FERRIERO, 2004).

Então, um dano no processo de produção energética mitocondrial resulta em acúmulo de superóxido e, se o processo de defesas antioxidantes estiver prejudicado, este ânion será convertido em uma espécie ainda mais reativa: o radical hidroxil. Estas espécies reativas promovem danos celulares irreversíveis devido à peroxidação das membranas celulares (MAGISTRETTI et al., 1999).

A falta de ATP faz com que as bombas iônicas dependentes de energia, responsáveis pela manutenção dos gradientes iônicos, não consigam exercer suas funções e a célula neuronal fica impossibilitada de desencadear um potencial de ação (PERLMAN, 2004).

A excitotoxicidade glutamatérgica é um importante mecanismo de dano desencadeado pela falha energética. Quando glutamato é liberado pelas vesículas sináptica do terminal pré-sináptico na fenda, ele ativa seus receptores pós-sinápticos (NMDA, AMPA e kainato). A remoção do glutamato da sinapse é feita por transportadores específicos presentes principalmente nos astrócitos. Este processo requer um maquinário energético celular intacto e

pode ser interrompido caso haja falta de energia, acarretando excesso de glutamato na fenda sináptica (AMATO e DONATI et al., 2000).

Este acúmulo de neurotransmissor promove uma hiperativação dos receptores glutamatérgicos, principalmente o NMDA, que através de canais iônicos permitem o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^{+}$ , despolarizando a célula. O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular promove uma cascata de eventos ativando enzimas proteases, endonucleases e fosfolipases que irão hidrolisar as membranas fosfolipídicas, com isso aumentando a formação de ácidos graxos livres e ácido araquidônico (MCLEAN e FERRIERO, 2004).

A estrutura e função do receptor NMDA são diferenciadas conforme espécie, região cerebral e estágio de desenvolvimento. Em um encéfalo em desenvolvimento, este receptor está mais expressado quando comparado com encéfalo maduro. Assim, a alta densidade e atividade deste receptor no período perinatal criam um efeito devastador quando há falha energética (YAGER, 2005).

Outro potencializador do dano cerebral na HIE são as citocinas, polipeptídeos que tem ação sistêmica ou local. Elas são ativadas pela HIE e estão relacionadas clinicamente com efeitos patológicos de inflamação cerebral (LEONARDO et al., 2009)

Para o estudo dos mecanismos patológicos e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas experimentais foram desenvolvidos modelos animais de lesão perinatal semelhantes à fisiopatologia encontrada em humanos após uma hipóxia-isquemia encefálica. O modelo deve contribuir para o entendimento dos processos patológicos, promover o entendimento da

evolução da lesão e suas conseqüências, e prover a possibilidade de desenvolver e testar estratégias terapêuticas (YAGER, 2005).

O método de Levine (1960), modificado por Rice e colaboradores (1981), é amplamente usado e reproduz uma lesão unilateral cerebral por oclusão permanente da artéria carótida comum promovendo uma isquemia, e a exposição por 90 minutos a uma atmosfera hipóxica com 92% de nitrogênio e 8% de oxigênio. Este modelo apresenta alta reprodutibilidade (WALTON et al., 1999), baixo custo, baixa mortalidade e produz um dano ipsilateral a lesão nas regiões do córtex cerebral, estriado e hipocampo (JANSEN e LOW et al., 1995; RODRIGUES et al., 2004; VANUCCI & VANUCCI, 2005; PEREIRA et al., 2007).

Muitos estudos que utilizaram este modelo animal demonstraram déficits de aprendizado e memória verificados nos testes do labirinto aquático de Morris, esQUIVA inibitória e mesa radial (IKEDA et al., 2001; WANG et al., 2002; BREDY et al., 2004; MISHIMA et al., 2005; HONMA et al., 2006; PEREIRA et al., 2007; PEREIRA et al., 2007). Associado a estes achados, o dano morfológico hipocampal também é descrito, sendo o volume hipocampal diminuído no lado ipsilateral à lesão (PEREIRA et al., 2007).

Complementando os estudos já bem caracterizados relacionados com déficits no aprendizado e memória, as alterações sensoriomotoras são investigadas e as anormalidades locomotoras e posturais não são tão evidentes como em humanos (JANSEN e LOW, 1996; KOHZUKI et al., 2006; PAZAITI et al., 2009). PAZAITI e colaboradores (2009) demonstraram que a HIE neonatal promoveu uma piora no desempenho das tarefas motoras ao longo da vida, causando um dano na coordenação e força muscular no teste de

Rota Rod e no teste de agarrar (*Grip Test*). Além desses, nos testes de reflexos posturais e nos de assimetrias do posicionamento das patas, também foram achadas diferenças significativas em animais submetidos à HIE (BONA et al., 1997).

Pesquisas mostraram que o gênero do animal influencia na extensão do dano HIE neonatal. ARTENI e colaboradores (2010) estudaram os efeitos do gênero e do hemisfério lesado pelo modelo de hipóxia isquemia neonatal proposto por Levine-Rice. Houve uma diferença comportamental sexo-dependente nos ratos, sendo que as fêmeas apresentaram maior deambulação espontânea e os machos um melhor desempenho em testes espaciais. Dados epidemiológicos evidenciam que bebês do sexo masculino são mais vulneráveis que os do sexo feminino, acarretando um número maior de meninos portadores de paralisia cerebral (REISS et al., 2004)

Todas as alterações referentes a este modelo de lesão HIE neonatal são condizentes com os achados observados em humanos recém-nascidos após encefalopatia por HIE, o que torna este modelo um importante aliado para os estudos fisiopatológicos e para o conseqüente desenvolvimento de novas estratégias de reabilitação.

## **1.2. Enriquecimento Ambiental**

Flehmg em 1987, sugeriu que a evolução estático-motora do recém-nascido até a idade adulta depende da maturação do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo determinada por padrões geneticamente estabelecidos e estímulos ambientais, e que todo desenvolvimento motor realiza-se sempre sob uma adaptação ideal aos estímulos externos. É esta interação de fatores

fisiológicos, psicológicos e ambientais a responsável pelo desenvolvimento das habilidades motoras (TECKLIN, 2002).

Em 2001, SANTOS realizou uma revisão de diversos trabalhos e concluiu que as diferenças no desenvolvimento motor, observadas em lactentes brasileiros, estão relacionadas às condições sócio-econômicas, educação dos pais, prematuridade e baixo peso ao nascimento, demonstrando com isso que o meio influencia o desenvolvimento neuropsicomotor da criança.

Se por um lado um ambiente pobre em estímulos pode prejudicar o desenvolvimento psicomotor, por outro, estímulos ambientais podem servir como estratégia de tratamento complementar a uma lesão neurológica como HIE (IKEDA et al., 2001).

Vários estudos são dedicados à modificação ambiental para promover a reabilitação funcional. O enriquecimento ambiental envolve uma combinação de interação social, exercício físico e contínua exposição a tarefas de aprendizagem, onde os animais permanecem num local rico em estímulos sensoriais, cognitivos e motores (PEREIRA et al., 2007).

Este ambiente proporciona aumento da neurogênese (HICKS et al., 2007), da sinaptogênese (DUFFY et al., 2001), da plasticidade neuronal hipocampal, da ativação do crescimento dendrítico hipocampal (BIERNASKIE e CORBETT, 2001), mudanças nos níveis de fator neurotrófico derivado-cérebro (BDNF) e da expressão gênica (KOLB e WHISHAW, 1998). Como consequência dessas modificações, há uma melhora nas tarefas de aprendizado e memória, recuperando déficits de lesões cerebrais (PEREIRA et al., 2007).

O ambiente é um importante aliado no processo de reabilitação neuropediátrica, sendo muito utilizado pelos profissionais da saúde (médicos, fisioterapeutas, fonoaudiólogos, terapeutas ocupacionais, psicopedagogos) que assistem o portador de encefalopatia crônica da infância. A adaptação do ambiente à criança afetada é importante para que ela possa ter uma boa interação, facilitando a aquisição de novas habilidades cognitivas e motoras proporcionadas pela necessidade de adaptação às novas experiências.

O enriquecimento ambiental é uma estratégia não invasiva, facilmente aplicada, capaz de recuperar os déficits cognitivos e motores e as alterações morfológicas e bioquímicas decorrentes da HIE neonatal. Estudos do nosso laboratório (PEREIRA et al., 2007; Pereira et al., 2008) já demonstraram os potenciais de recuperação cognitiva, mas não de recuperação sensoriomotora.

Considerando os benefícios comportamentais e motores do ambiente enriquecido, esta intervenção se torna de extrema valia para o tratamento da lesão hipóxico-isquêmica encefálica neonatal. Assim, trabalhamos com a hipótese de que a HIE neonatal promove um dano motor, e que o enriquecimento ambiental irá recuperar, parcial ou totalmente, este dano.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento motor em dois momentos do desenvolvimento (Experimento 1) e os possíveis benefícios do enriquecimento ambiental (Experimento 2) em ratos submetidos à hipóxia-isquemia cerebral neonatal. Para complementar os dados comportamentais, foi feita uma avaliação morfológica para mensurar o dano promovido pela lesão nas estruturas de interesse.

### **2.2. Objetivos Específicos**

#### **2.2.1. Experimento 1**

2.2.1.1. Avaliar o desempenho motor de ratos submetidos à lesão hipóxico-isquêmica neonatal em dois momentos do desenvolvimento: 22 e 42 dias pós-natal. Para isto utilizamos os seguintes testes: do Rota Rod e de suspensão na barra.

2.2.1.2. Analisar a influência do gênero no desempenho motor de ratos submetidos à HIE.

#### **2.2.2 Experimento 2**

2.2.2.1. Avaliar o desempenho motor de ratos submetidos à lesão hipóxico-isquêmica neonatal e posteriormente a um protocolo de enriquecimento ambiental. Para isto utilizamos os seguintes testes: do Rota Rod, de suspensão na barra e da caminhada na escada horizontal.

2.2.2.2. Analisar a influencia do gênero no desempenho motor de ratos submetidos à HIE.

2.2.2.3. Avaliar a extensão da lesão, mensurando o volume do hipocampo direito e esquerdo e área do estriado direito e esquerdo.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

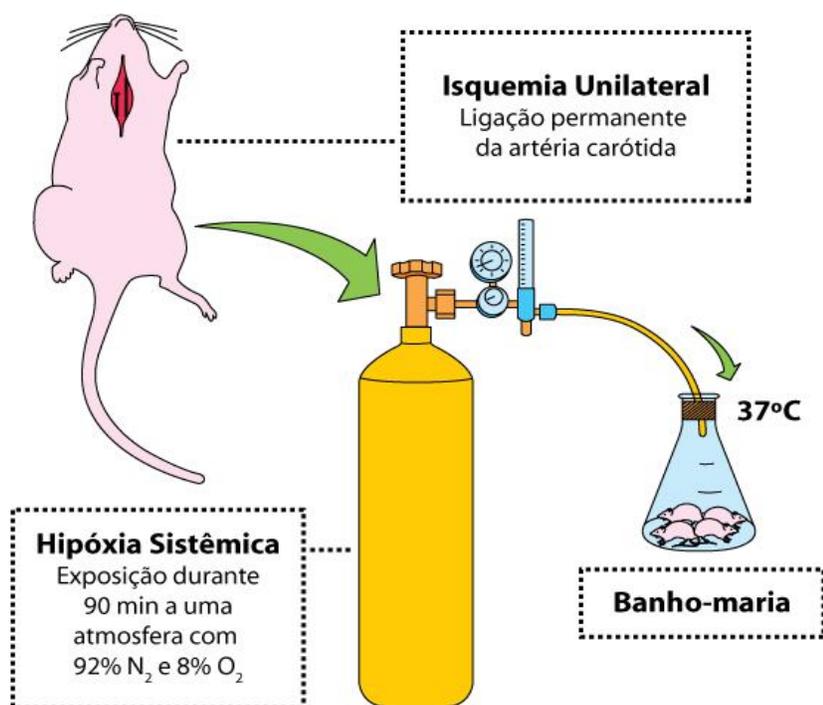
#### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da espécie *Rattus Norvegicus*, linhagem Wistar, a partir do sétimo dia pós-natal, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas de Saúde da UFRGS. Os animais receberam ração padronizada (Germânia) e água *ad libitum* e foram mantidos em ambiente climatizado (25° C), com ciclo claro/escuro de 12 horas. O trabalho estava de acordo com normas e cuidados com os animais sob aprovação do Comitê de Bioética da UFRGS de protocolo número 2008089.

#### **3.2 Hipóxia-isquemia (HI)**

O modelo experimental adotado para o procedimento de HI neonatal foi baseado na preparação de Levine (1960) e modificado por Rice e colaboradores (1981), para ratos neonatos, que produz dano unilateral no encéfalo do rato (Figura 1). No sétimo dia pós-natal, os ratos foram anestesiados com halotano, foi realizada uma incisão na região ventral do pescoço e os tecidos foram afastados até a exposição da artéria carótida

comum esquerda, para que esta fosse isolada e ocluída permanentemente com fio de sutura. Três horas após a oclusão, os animais foram expostos a uma atmosfera hipóxica (8% de Oxigênio e 92% de Nitrogênio) por 90 min. Durante esse período, foram mantidos em uma câmara de 1500 mL parcialmente imersa em um banho-maria à temperatura controlada de 37°C (PEREIRA et al., 2007).



**Figura 1.** Desenho ilustrativo do procedimento de hipóxia isquemia neonatal.

### 3.3. Ambiente Enriquecido

Os animais submetidos ao ambiente enriquecido seguiram protocolo de PEREIRA e cols., (2007) e PEREIRA e cols., (2008).

No DPN8 as ninhadas foram colocadas, junto das mães, em caixas moradias com brinquedos de diferentes texturas, formas e sons. Estes

brinquedos eram trocados semanalmente, quando feita a limpeza da gaiola. Após o DPN22, as ninhadas foram separadas das mães, divididas por sexo e colocadas em moradias padrão, quando o enriquecimento passou a ser diário. Os animais foram colocados em grupos de 8-10 em gaiolas de 3 andares, enriquecidas com rodas de exercício e diferentes brinquedos (textura, sons, brilhos e formas). Eles permaneceram durante 1 hora nas gaiolas, durante 6 dias da semana, quando então os brinquedos eram trocados e a limpeza feita semanalmente.

### **3.4. Análise Comportamental**

#### **3.4.1. Teste Rota Rod**

O Rota Rod é um teste que permite avaliar a coordenação motora, o equilíbrio e a força muscular (PAZAITI et al., 2009). O aparelho utilizado é um Rota Rod Treadmill for Mice 7600 (da UGO BASILE), que consiste num cilindro com diâmetro de 3 centímetros, suspenso 20 centímetros da superfície do aparelho, movido por um motor que mantém uma velocidade constante (Figura 2). O animal é colocado sobre o cilindro e é cronometrado o tempo de permanência até a queda, sendo o tempo máximo de 300 s. Para o experimento 1 foi utilizada velocidade de 16 rotações por minuto (16 rpm) e no experimento 2 foi utilizado 26 rpm.

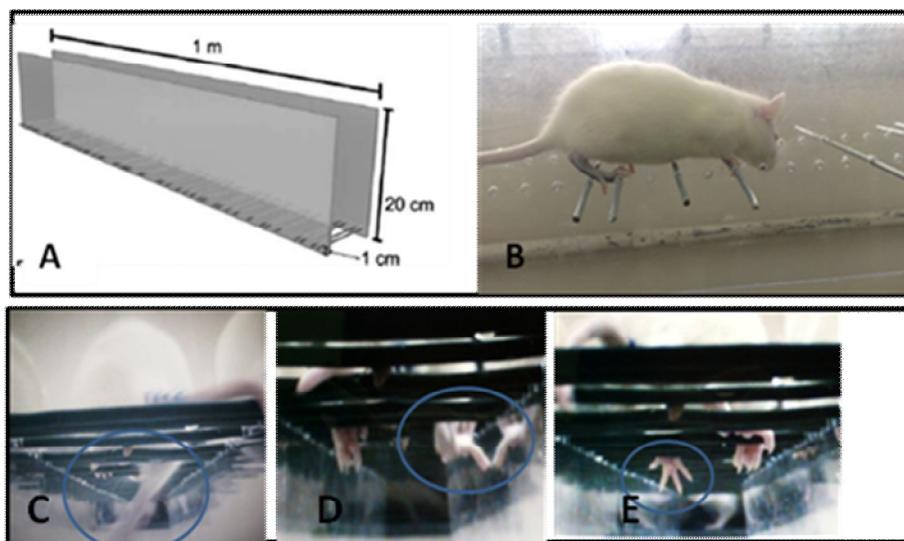
Inicialmente os animais foram habituados ao aparato por 30 segundos e após foram iniciadas as sessões de avaliação. Realizaram 2 sessões por dia com intervalo de 1 hora entre elas, durante 3 dias consecutivos para permitir que o aprendizado da tarefa ocorresse (LIU et al., 2007).



**FIGURA 2:** Foto ilustrativa do aparelho ROTA ROD.

### **3.4.2. Teste da Escada Horizontal**

O equipamento utilizado para realização do Teste da Caminhada sobre a Escada Horizontal (*Ladder Walking Test*) que consiste de duas chapas de acrílico transparentes (100 cm de comprimento x 20 cm altura) com furos em sequência a cada 1 cm, onde hastes metálicas de 3 milímetros de diâmetro cruzam e ligam as paredes acrílicas. O aparato foi colocado horizontalmente e elevado a 30 cm do chão. Os animais foram estimulados a atravessar o aparelho 2 vezes por dia durante 3 dias consecutivos. Visando avaliar a coordenação sensoriomotora e prevenir o aprendizado do animal na tarefa, a posição das hastes foi modificada a cada sessão de treino. Todos os cruzamentos no aparelho foram filmados para posterior análise do número de erros cometidos com os membros anteriores e posteriores (METZ & WHISHAW; 2002). Foram considerados 3 tipos de erros: erro total, quando o animal errava completamente o apoio do membro; deslize, quando cometia um deslize e logo reposicionava o membro corretamente na haste; e apoio parcial, quando o animal utilizava duas ou mais hastes para realizar o apoio de um membro (Figura 3).



**Figura 3.** **A.** Desenho ilustrativo da Escada Horizontal (METZ e WHISHAW, 2002). **B.** Foto do rato sobre a Escada Horizontal. **C.** Foto do rato caminhando sobre o aparelho cometendo um erro total com a pata posterior direita. **D.** Foto do rato caminhando sobre o aparelho cometendo um apoio parcial com a pata posterior direita. **E.** Foto do rato caminhando sobre o aparelho cometendo um deslize com a pata anterior esquerda.

### 3.4.3. Teste de Suspensão

O teste de suspensão serve para avaliar força e coordenação (Figura 4). O animal era suspenso em um cabo de aço revestido (com 3 milímetros de diâmetro) bem esticado, distante 1 metro do chão, tendo que ficar agarrado pelas membros anteriores por um tempo limite de 60 segundos (PAZAITI et al., 2009). Uma bandeja de espuma era posta sob o aparato para amortecer as quedas. Foram registrados a latência de queda e o deslocamento horizontal por meio de intervalos pintados a cada 10 centímetros. Foi realizado 1 teste por dia durante 3 dias consecutivos.



**Figura 4:** Foto ilustrativa do Teste de Suspensão.

### **3.5. Coleta e Preparação da Amostra**

Foi realizada a perfusão transcardíaca com solução salina seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (TP) 0,2 Mol, ph 7,4. Inicialmente o animal foi anestesiado com hidrato de cloral (30%, 10mL/kg via intraperitoneal) e uma toracotomia foi realizada para exposição do coração. Um cateter metálico ligado a bomba de perfusão foi introduzido na artéria aorta para perfundir 150 mL de cada solução. Uma dose de 1000 UI de heparina foi administrada previamente à solução salina para evitar a formação de coágulos no espaço intravascular. A aorta descendente foi clampeada e um corte no átrio direito foi realizado para drenagem das soluções administradas.

Após, os encéfalos foram removidos da caixa craniana, pós-fixados em na mesma solução fixadora a 4°C até afundar e, posteriormente, crioprotégidos em sacarose 30% para serem congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C. Secções coronais de 40 micrometros dos encéfalos foram feitas, utilizando o criostato (Leitz, Alemanha), nas estruturas selecionadas para análise morfológica. Para esta análise, os cortes foram corados com a técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)

em lâminas gelatinizadas e o método de Cavalieri foi utilizado para mensuração do volume.

### **3.5.1. Volume do Hipocampo**

O volume hipocampal foi calculado pela soma das áreas multiplicado pelo intervalo entre cortes, de acordo com o método de Cavalieri (MIKI et al., 2005; RODRIGUES et al., 2004). Todo o hipocampo foi seccionado em cortes coronais de 40 micrômetros com intervalos de 280 micrômetros entre cada fatia. As fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas e coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). As imagens das lâminas foram capturadas e digitalizadas por um scanner com resolução de 600 dpi e com auxílio do software Image J (NIH, USA) os hipocampos direito e esquerdo foram delineados e suas áreas mensuradas. O limite anterior foi o primeiro corte com células piramidais hipocampais tingidas pela HE e o limite posterior foi o último corte com células granulares do giro denteado (entre as coordenadas Bregma - 1.80 mm e -6.80 mm do Atlas Paxinos e Watson, 2004).

### **3.5.2. Área do Estriado**

Conforme metodologia já utilizada por PEREIRA e cols. (2007), a área do estriado foi medida por 4 secções de cortes coronais com 40 micrômetros, seguindo a coordenada Bregma 1.20 mm do Atlas de Coordenadas Estereotáxicas (Paxinos e Watson, 2004). As fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas e coradas com HE. As imagens foram capturados e digitalizados por um scanner com resolução de 600 dpis e através do software

Image J (NIH, USA) apenas uma secção foi utilizada (o corte que representa a coordenada bregma 1.20 mm) e a área do estriado direito e esquerdo foi delineada e mensurada.

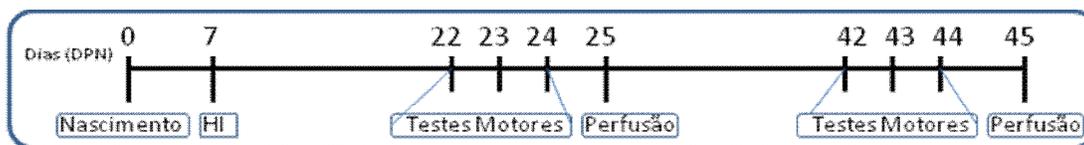
### **3.6. Desenho Experimental**

Para a realização desta Dissertação foram feitos 2 experimentos.

#### **3.6.1 Experimento 1**

No primeiro experimento, as ninhadas com machos e fêmeas (mínimo de 4 e máximo de 8 filhotes/ninhada) foram aleatoriamente selecionadas e submetidas ao modelo de lesão de hipóxia isquêmica neonatal (HI) no sétimo dia pós-natal (7DPN). Os animais que fizeram parte do grupo controle (CT) foram anestesiados, tiveram a artéria carótida comum esquerda exposta, mas não ocluída. Com 21 dias de vida, as ninhadas foram separadas das mães e divididas por sexo. Na sequência, foram aleatoriamente separadas em dois grupos: grupo 22 e grupo 42. O grupo 22 foi submetido aos testes motores a partir do 22º DPN e o grupo 42 foi submetido aos testes motores a partir do 42º DPN. Após o término dos testes motores foi realizada a perfusão transcardíaca, e os encéfalos retirados para posterior análise.

Os testes comportamentais foram realizados durante 3 dias consecutivos (Figura 5). Para o teste do Rota Rod, foram realizados duas sessões por dia com intervalo de 1 hora, totalizando 6 sessões. A velocidade utilizada foi de 16 rpm. No teste de Suspensão, uma sessão por dia foi realizada (PAZAITI et al., 2009).



**Figura 5.** Linha do tempo representativa do experimento 1.

### 3.6.1.1. Grupos Experimentais

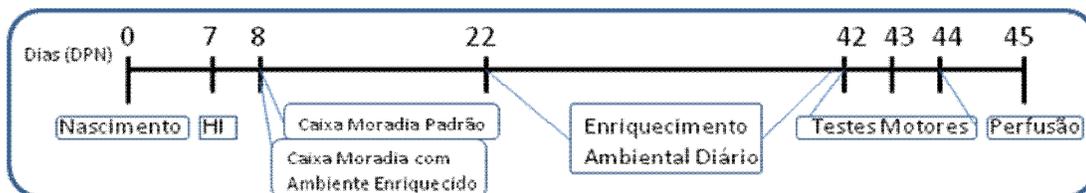
Os animais foram divididos em 4 grupos:

1. CT 22 DPN, n= 11 machos e n=9 fêmeas;
2. HI 22 DPN, n= 9 machos e n= 8 fêmeas;
3. CT 42 DPN, n= 8 machos e n= 8 fêmeas;
4. HI 42 DPN, n= 7 machos e n= 9 fêmeas.

### 3.6.2 Experimento 2

No segundo experimento, as ninhadas (mínimo de 4 e máximo de 8) foram aleatoriamente separadas em 4 grupos: animais controle no ambiente padrão (CT-AP), animais HI no ambiente padrão (HI-AP), animais controle no ambiente enriquecido (CT-AE) e animais HI no ambiente enriquecido (HI-AE). O grupo HI passou por todo o procedimento de oclusão da artéria carótida comum esquerda, seguido da atmosfera hipóxica e o grupo CT foi apenas anestesiado com a exposição da artéria carótida esquerda, mas não foi ocluída. Os animais do grupo AP permaneciam em suas caixas padrão até o final do experimento. Os animais do grupo AE, no 8ºDPN, eram colocados, juntos com a mãe, em uma gaiola com brinquedos de formas, texturas e sons

diversos, sendo esta a sua nova moradia até o 21ºDPN. Os brinquedos eram trocados e lavados a cada 7 dias. No dia 21 pós-natal foram separados das mães e por sexo e assim alojados em caixas padrões com ocupação de 4-6 animais. A partir do 22DPN, as ninhadas eram submetidos 1 hora por dia durante 6 dias da semana, à permanecer nas gaiolas enriquecidas (PEREIRA et al., 2007). Este ambiente enriquecido era composto por brinquedos diversos, rodas para exercício, rampas para acesso aos andares da gaiola e interação social, pois os animais conviviam em grupos de 7 a 10. A limpeza e a troca de brinquedos era feita a cada 7 dias. No 42DPN, iniciavam os testes comportamentais e, ao término dos testes motores, os animais eram perfundidos transcárdiacamente e os encéfalos retirados para posterior análise morfológica.



**Figura 6.** Linha do tempo representativa do Experimento 2.

### 3.6.2.1. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos:

1. (CT-AP), n=12 machos e n= 11 fêmeas;
2. (CT-AE), n=14 machos e n=9 fêmeas;
3. (HI-AP), n= 15 machos e n=9 fêmeas;
4. (HI-AE), n=10 machos e n=10 fêmeas.

### **3.7. Análise Estatística**

Os dados dos testes Rota Rod, Escada Horizontal e Suspensão na Barra são paramétricos e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas seguido do teste *post hoc* de Duncan para múltiplas comparações. Os dados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão.

As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas através de software *Statistica*.

## 4. RESULTADOS

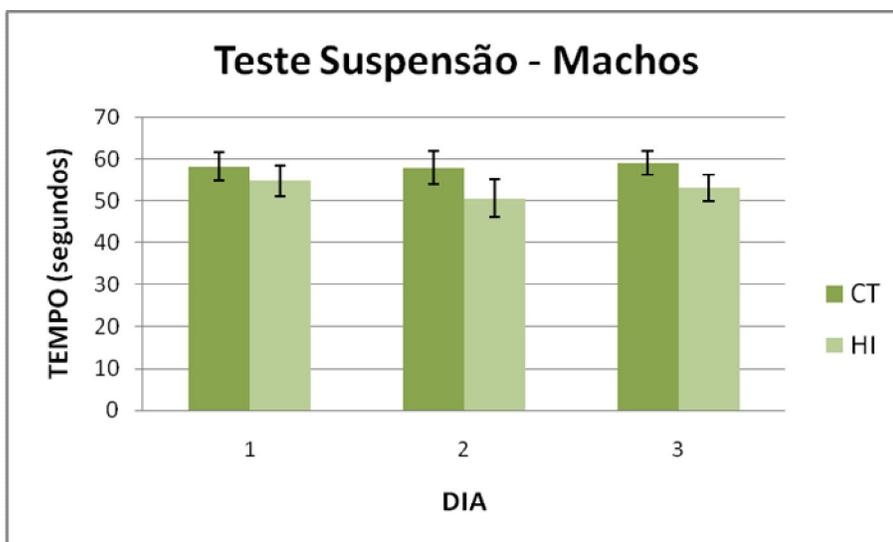
### 4.1. Resultados do Experimento 1

#### 4.1.1 Grupo 22 DPN

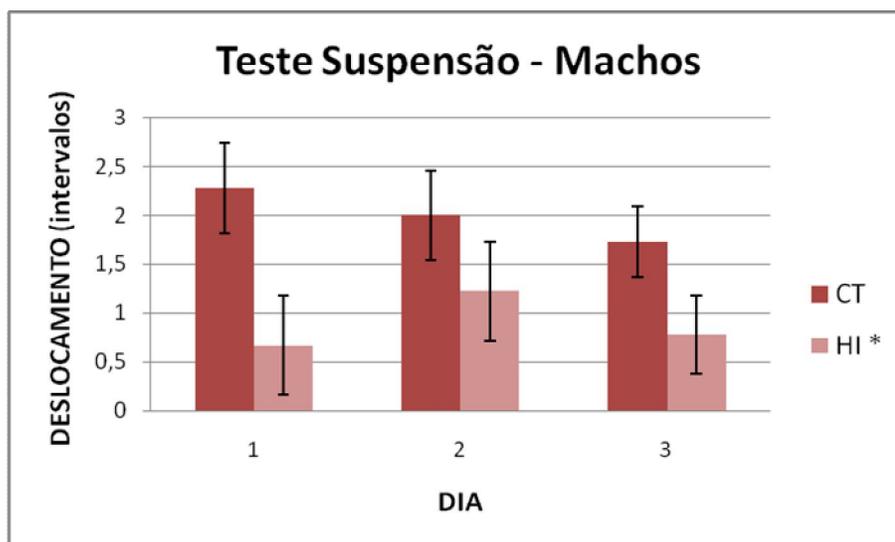
##### 4.1.1.1 Teste de Suspensão

Os dados referentes ao teste de suspensão nos ratos machos estão apresentados nas figuras 7 e 8. As variáveis tempo de suspensão e deslocamento foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post hoc* de Duncan. Quanto ao tempo de suspensão, não houve diferença significativa. Na variável deslocamento, os animais HI deslocaram-se menos que os CT conforme resultado geral da ANOVA ( $F(1,18)=4,9$   $p=0,04$ ), contudo sem distinção entre os dias de teste.

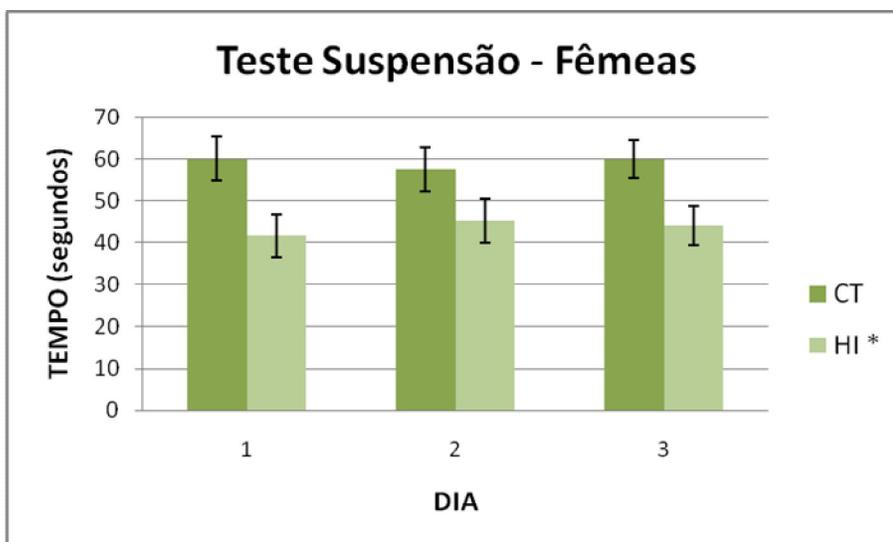
Na análise das fêmeas, o resultado geral da ANOVA de medidas repetidas mostrou uma diferença estatística no fator lesão para o tempo de suspensão ( $F(1,14)=9,9$   $p=0,006$ ) e para o deslocamento pela barra ( $F(1,14)=10,7$   $p=0,005$ ), sendo os animais HIE com menor tempo e deslocamento (Figura 9). O teste *post hoc* de Duncan mostrou uma tendência do grupo HI deslocar-se menos que o grupo CT no primeiro dia ( $p=0,07$ ), e no 3º dia a diferença foi significativa ( $p=0,05$ ) (Figura 10).



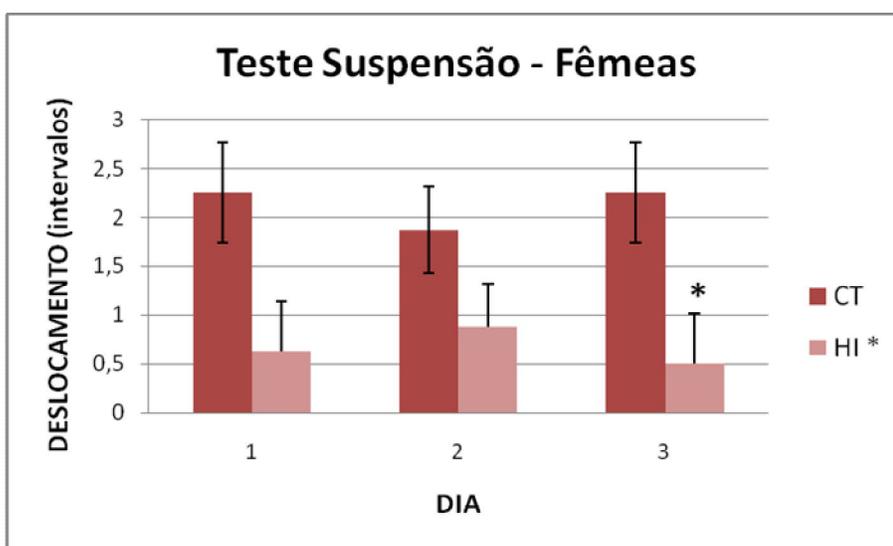
**Figura 7:** Tempo de suspensão na barra dos machos (tempo máximo 60s). Os dados foram expressados como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste *post hoc* de Duncan.



**Figura 8:** Deslocamento na barra dos machos. Os dados foram expressados como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*Diferença significativa no resultado geral ANOVA na variável lesão.



**Figura 9:** Tempo de suspensão na barra das fêmeas (tempo máximo 60s). Os dados foram expressados como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \* Diferença significativa no resultado geral da ANOVA na variável lesão.

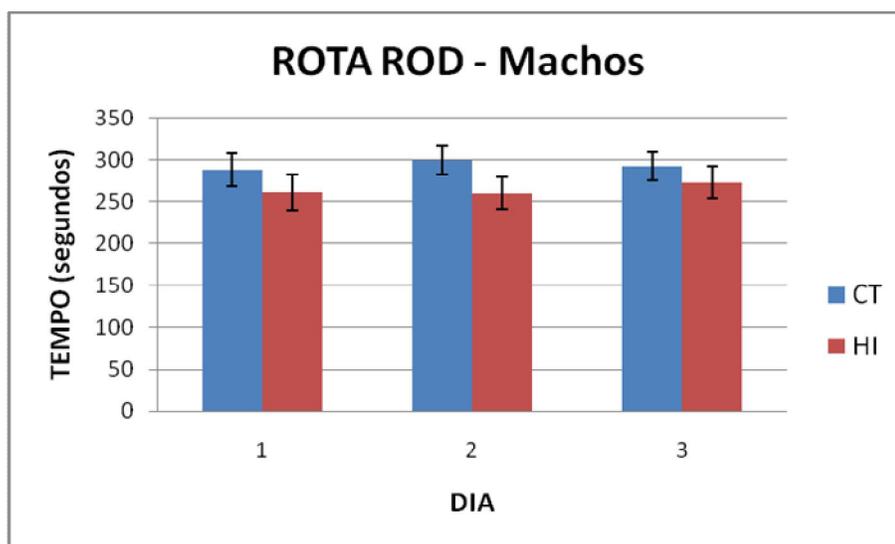


**Figura 10:** Deslocamento na barra das fêmeas (1 intervalo = 10cm). Os dados foram expressados como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \* Diferença

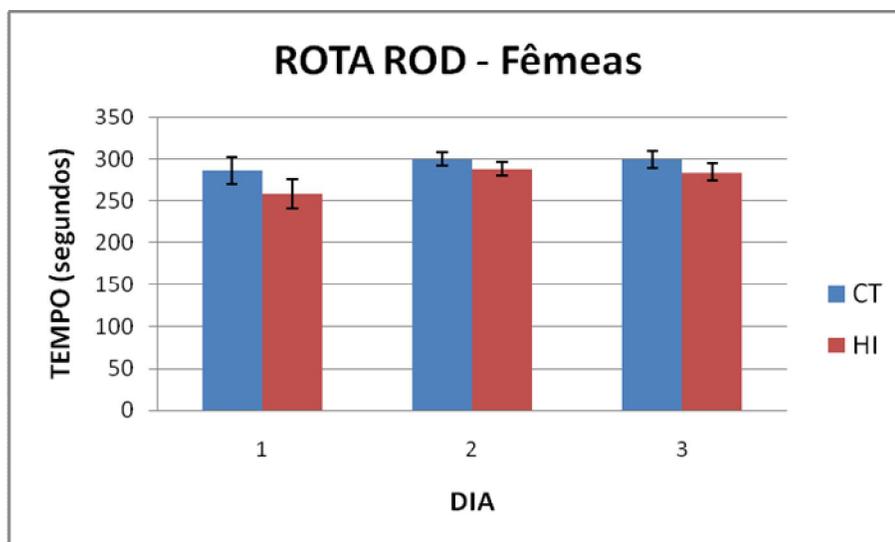
significativa no resultado geral ANOVA na variável lesão. \* Diferença significativa no *post hoc* Duncan.

#### 4.1.1.2 Rota Rod

Não houve diferença significativa quanto à latência de queda entre os grupos em ratos machos e fêmeas com 22DPN. Os animais apresentaram desempenho similar quanto ao equilíbrio, coordenação e força. A análise foi feita através da ANOVA de medidas repetidas seguido do *post hoc* Duncan. As Figuras 11 e 12 apresentam esses resultados.



**Figura 11** – Latência de queda do cilindro no teste *Rota Rod* (tempo máximo= 300 segundos). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan.



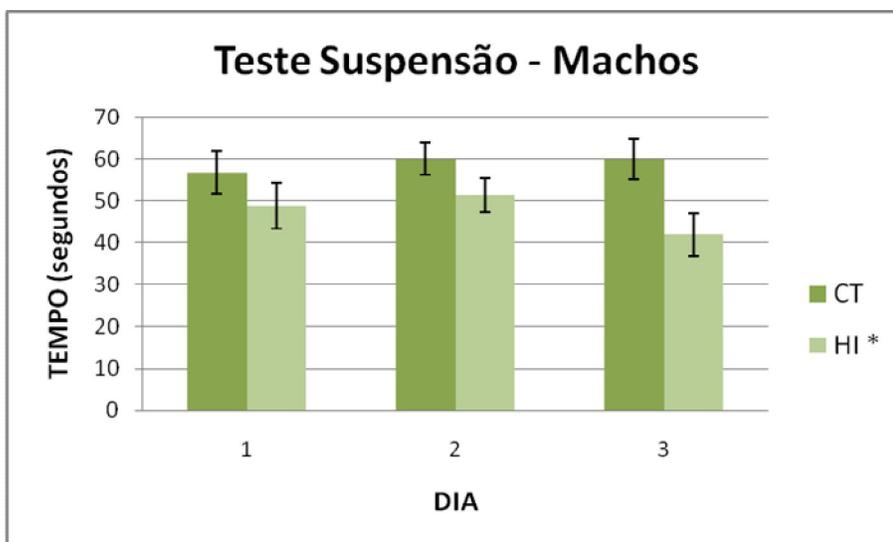
**Figura 12** – Latência de queda do cilindro no teste *Rota Rod* (tempo máximo= 300 segundos). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan.

#### 4.1.2. Grupo 42 DPN

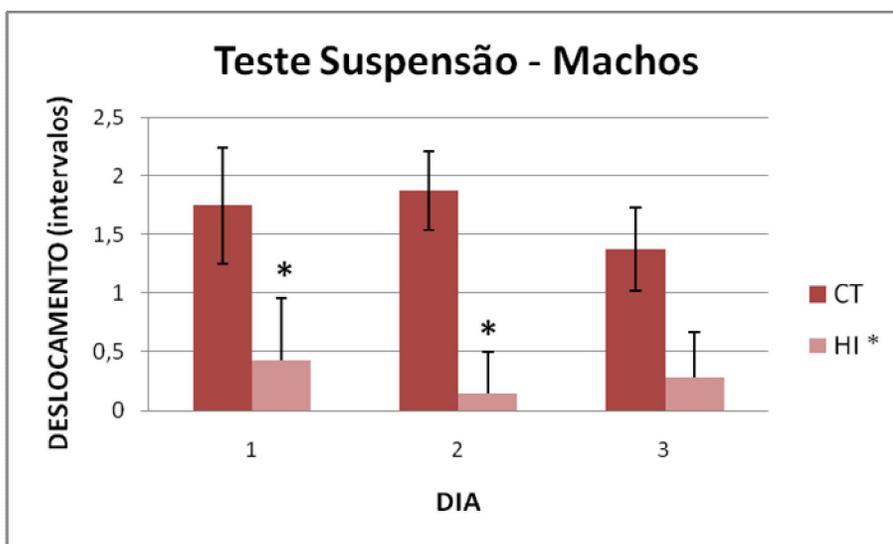
##### 4.1.2.1. Teste Suspensão

Nos animais do grupo com 42 dias de vida o teste de suspensão foi analisado pela ANOVA de medidas repetidas seguida do *post hoc* de Duncan. Nos machos, quando analisado o tempo de suspensão, o resultado geral da ANOVA mostrou uma diferença estatística no fator lesão ( $F(1,13)=4,3$   $p=0,05$ ). Quando analisado o deslocamento na barra, o resultado geral da ANOVA, indicou uma diferença significativa na variável lesão ( $F(1,13)=18,5$   $p=0,000$ ). O teste de Duncan mostrou uma diferença também entre os dias 1 ( $p=0,04$ ) e 2 ( $p=0,01$ ), quando os ratos do grupo HI deslocaram-se menos que os do grupo CT (Figura 13 e 14).

A análise estatística do desempenho das fêmeas no teste de suspensão não mostrou diferença significativa entre os grupos HI e CT (Figura 15 e 16).

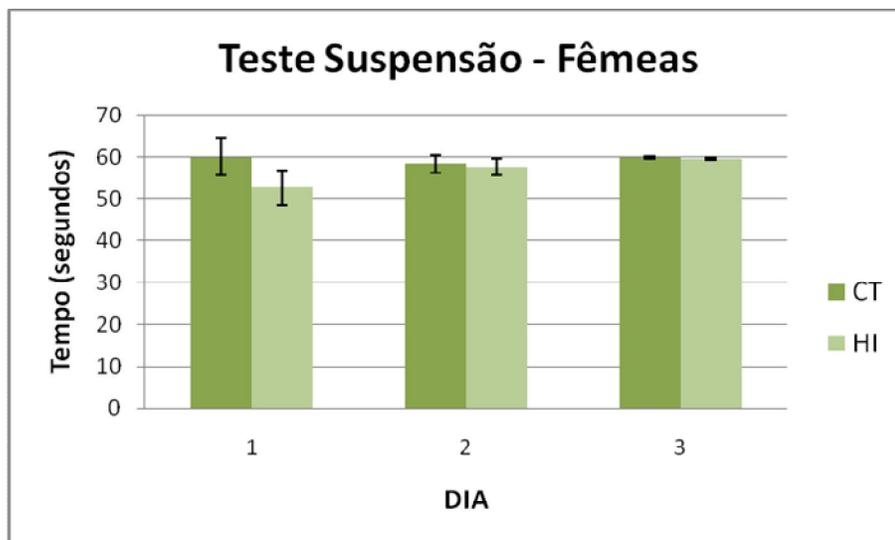


**Figura 13:** Tempo de suspensão dos machos do grupo 42DPN (tempo máximo 60s). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*Diferença significativa no resultado geral da ANOVA na variável lesão.

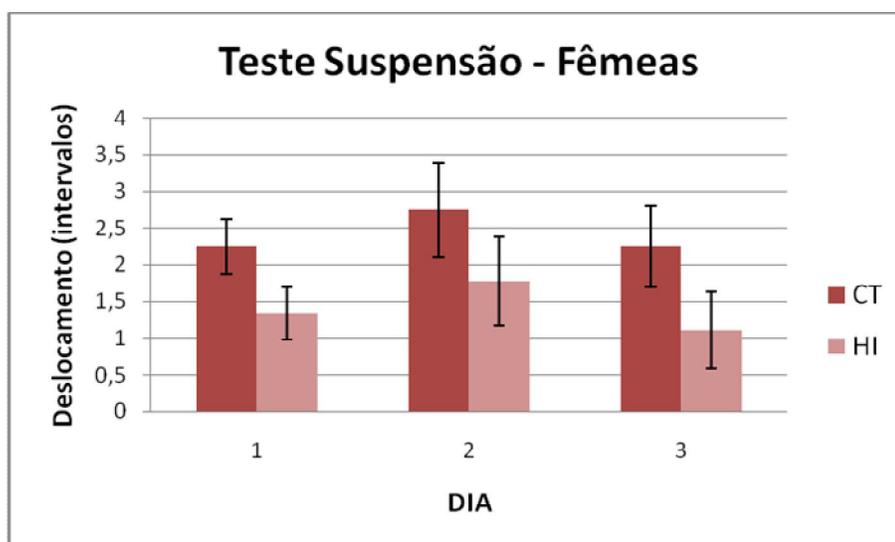


**Figura 14:** Deslocamento na barra dos machos do grupo 42DPN. Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \* Diferença significativa no

resultado geral da ANOVA na variável lesão. \* Diferença no *post hoc* Duncan entre o grupo HI e CT.



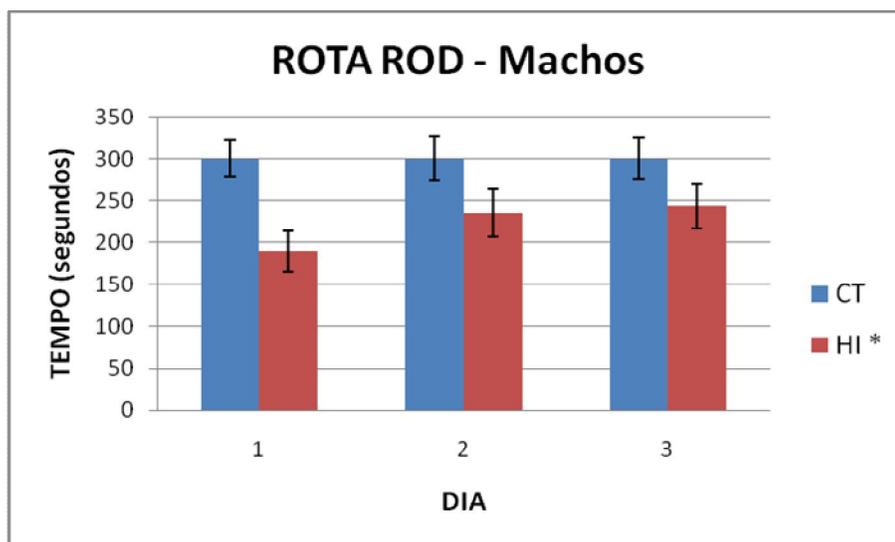
**Figura 15:** Tempo suspensão na barra das fêmeas com 42DPN (tempo máximo 60s). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan.



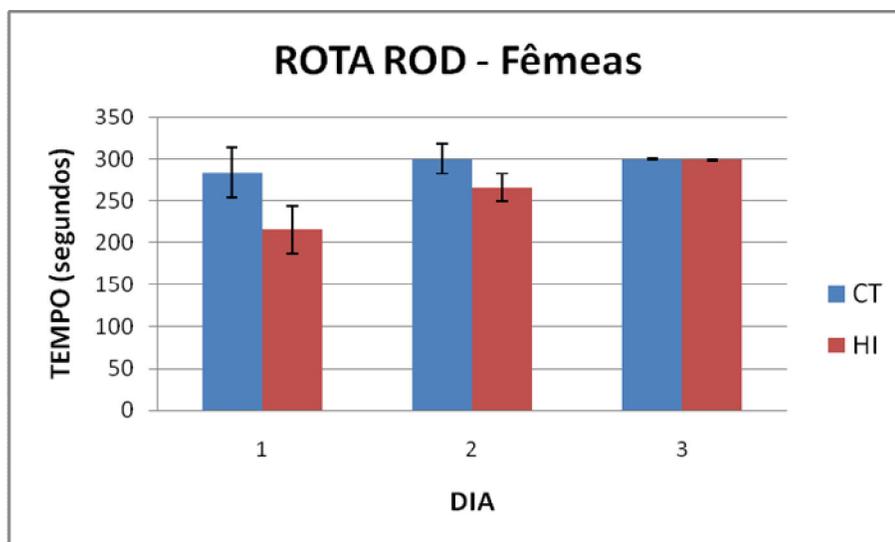
**Figura 16:** Deslocamento na barra das fêmeas com 42DPN. Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan.

#### 4.1.2.2 Rota Rod

O resultado do teste Rota Rod em machos com 42DPN é apresentado na Figura 17 e o das fêmeas na Figura 18. Em machos, o resultado geral da ANOVA de medidas repetidas indicou uma diferença significativa no fator lesão ( $F(1,13)=5,09$   $p=0,04$ ) quanto ao tempo de queda do cilindro giratório do Rota Rod, sem diferença entre os dias. Em fêmeas, não houve diferença significativa no tempo de queda do cilindro do Rota Rod entre os grupo lesão e controle.



**FIGURA 17** – Latência de queda do cilindro do *Rota-Rod*. Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \* Diferença significativa no resultado geral da ANOVA na variável lesão.



**FIGURA 18** – Latência de queda do cilindro do *Rota-Rod*. Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan.

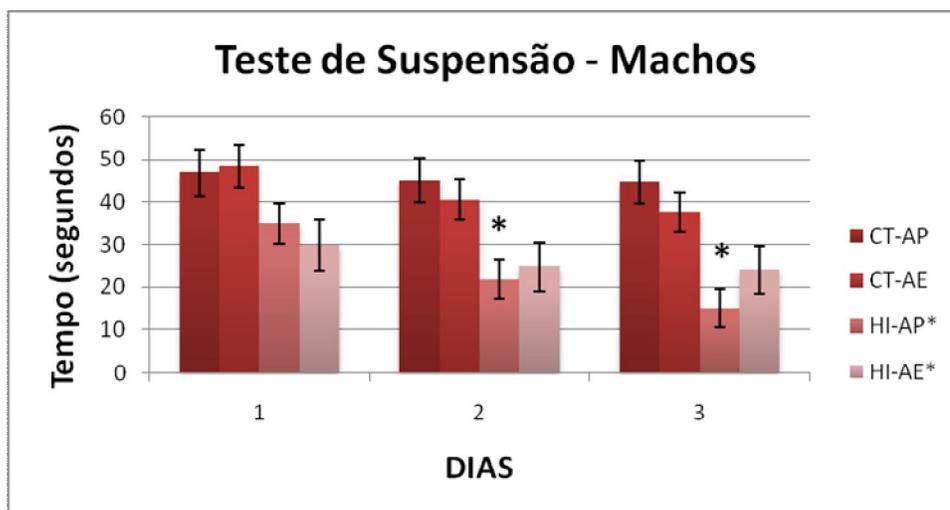
## 4.2 Resultados do Experimento 2

### 4.2.1 Teste de Suspensão

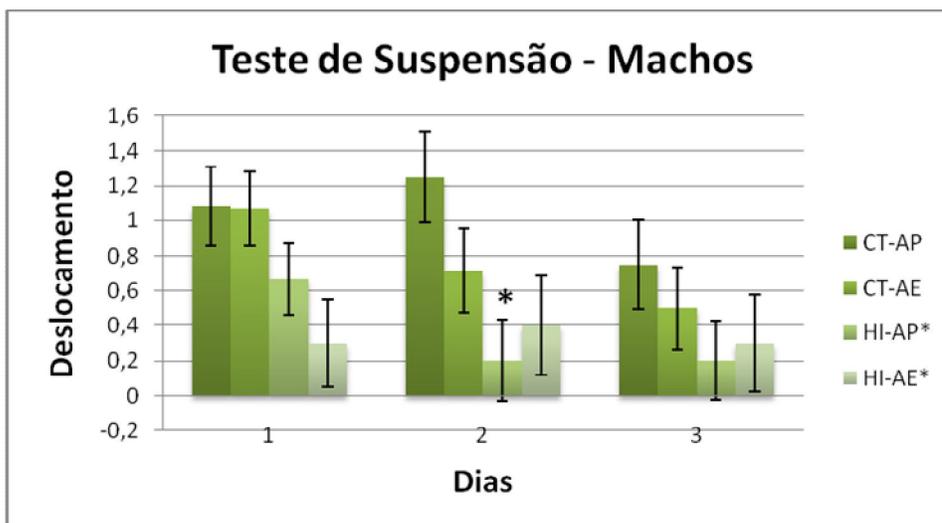
Foi analisado o tempo de permanência e o deslocamento pelos intervalos (1 intervalo = 10 cm) por animal durante o teste. Quando avaliados os ratos machos, o resultado geral da ANOVA (2 vias) de medidas repetidas mostrou uma diferença significativa quanto a variável lesão ( $F(1,47)=24,0$   $p=0,000$ ), e o teste *post hoc* Duncan indicou uma diferença estatística significativa entre os dias, onde os animais do grupo HI-AP permaneceram menos tempo que os animais do grupo CT-AP no dia 2 ( $p=0,038$ ) e no dia 3 ( $p=0,008$ ), conforme mostra a Figura 19. Não houve diferença entre os grupos HI-AE e CT-AP, assim como nos grupos HI-AE e HI-AP. Isso nos mostra uma recuperação parcial dos efeitos da lesão pelo ambiente enriquecido. Avaliando

o deslocamento, o resultado geral da ANOVA mostrou uma diferença na variável lesão ( $F(1,47)=9,5$   $p= 0,003$ ), e o post hoc Duncan mostrou uma diferença significativa no dia 2 ( $p= 0,048$ ) na qual, o grupo HI-AP deslocou-se menos pela barra comparado com o grupo CT-AP no dia 2 (Figura 20).

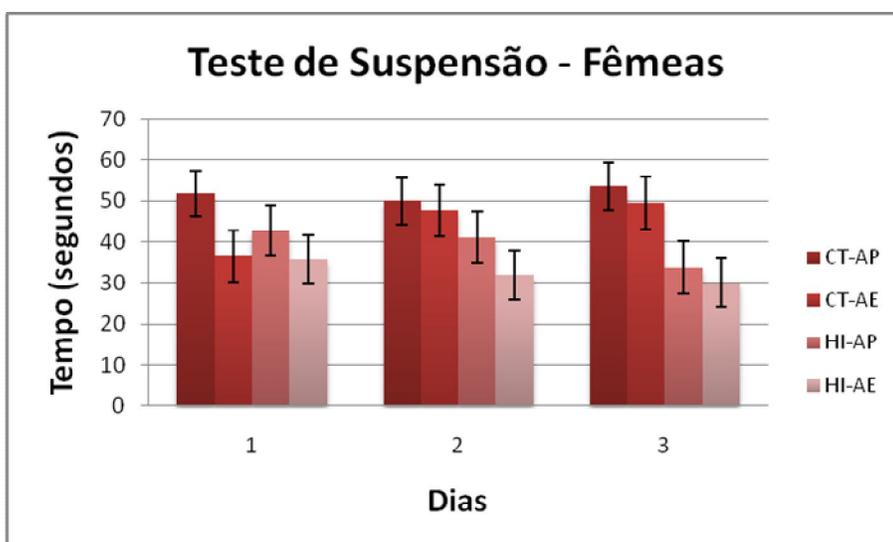
No grupo das fêmeas, a Figura 21 mostra que não foi encontrada diferença significativa pela ANOVA (2vias) de medidas repetidas, quanto ao tempo suspenso na barra. Quanto ao deslocamento, o resultado geral da ANOVA não mostrou diferença na variável lesão, e o post hoc Duncan verificou que os animais do grupo HI-AE deslocaram-se significativamente menos que os CT-AP ( $p= 0,032$ ) no primeiro dia, mostrado na Figura 22.



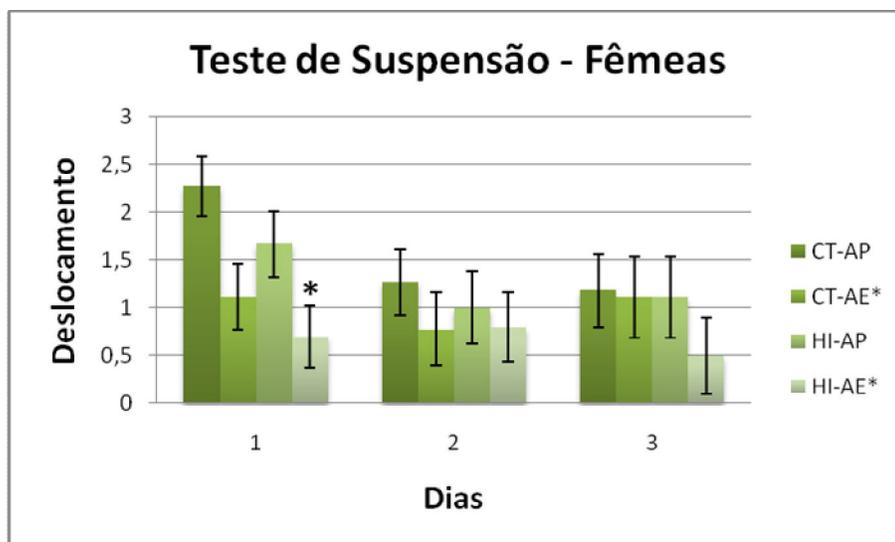
**Figura 19:** Tempo de suspensão dos machos na barra (tempo máximo 60s). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA (2vias) de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p<0,05$ . \*Diferença no resultado geral da ANOVA na variável lesão. \*Diferença no *post hoc* Duncan entre o grupo HI-AP e CT-AP.



**Figura 20:** Deslocamento dos machos na barra. Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA (2 vias) de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*Diferença no resultado geral da ANOVA na variável lesão. \*Diferença no *post hoc* Duncan entre grupo HI-AP e CT-AP.



**Figura 21:** Tempo suspenso das fêmeas na barra (tempo máximo 60s). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA (2 vias) de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan.



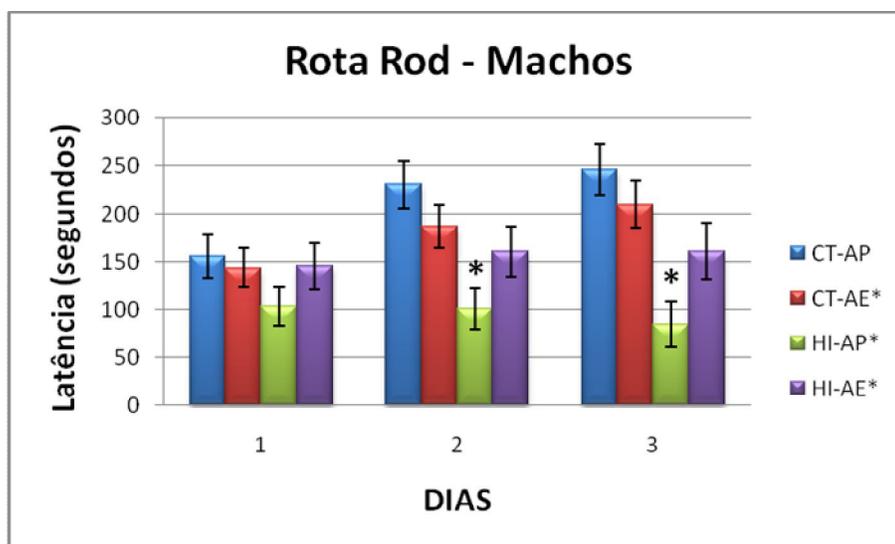
**Figura 22:** Deslocamento das fêmeas na barra. Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA (2 vias) de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*Diferença no resultado geral da ANOVA na variável ambiente. \*Diferença no *post hoc* Duncan entre o grupo HI-AE e CT-AP.

#### 4.2.2. Rota Rod

O teste do Rota Rod foi analisado através da ANOVA (2 vias) de medidas repetidas seguido do *post hoc* Duncan. Entre os machos, o resultado geral da ANOVA mostrou uma diferença estatística na variável lesão ( $F(1,47)=11,3$   $p=0,001$ ) e lesão X ambiente ( $F(1,47)=4,8$   $p=0,03$ ). O *post hoc* Duncan mostrou uma diferença estatística no tempo de permanência sobre o cilindro do Rota Rod entre os grupos HI-AP e CT-AP no dia 2 ( $p=0,032$ ) e 3 ( $p=0,008$ ) de avaliação. Os animais do grupo HI-AP foram estatisticamente

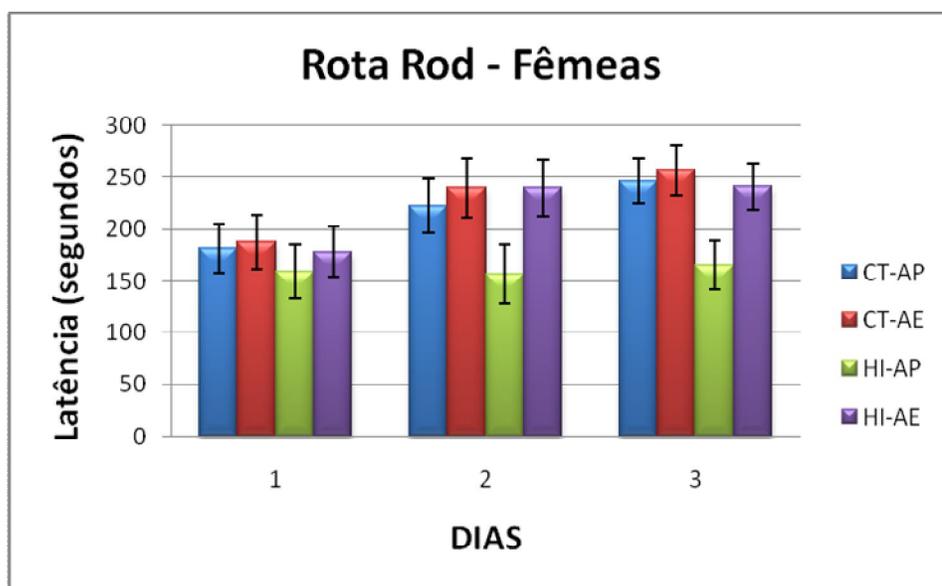
iguais aos HI-AE, e estes, HI-AE, foram iguais aos CT-AP. Com esses resultados, pode se verificar uma recuperação parcial da lesão pelo ambiente enriquecido. Pela análise dos tempos ao longo dos dias, observou-se que os animais lesados (HI-AP e HI-AE) não apresentaram uma curva de aprendizagem da tarefa.

Na avaliação das fêmeas, a ANOVA (2 vias) de medidas repetidas seguida do post hoc Duncan, não mostrou diferença estatística significativa entre os grupos quando avaliado o tempo de permanência sobre o aparelho (Figura 24). Um resultado observado é que as fêmeas do grupo HI-AE apresentaram uma curva de aprendizagem durante os dias de avaliação, diferente das fêmeas do grupo HI-AP que não apresentaram esta curva de aprendizagem da tarefa. Isto é, o ambiente enriquecido favoreceu o aprendizado da tarefa.



**Figura 23:** Latência de queda dos machos do Rota Rod (tempo máximo 300 segundos). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram

analisados por ANOVA (2 vias) de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*Diferença no resultado geral da ANOVA nas variáveis lesão e ambiente. \*Diferença no *post hoc* Duncan entre grupo HI-AP e CT-AP.



**Figura 24:** Latência de queda das fêmeas do Rota Rod (tempo máximo 300 segundos). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA (2 vias) de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan.

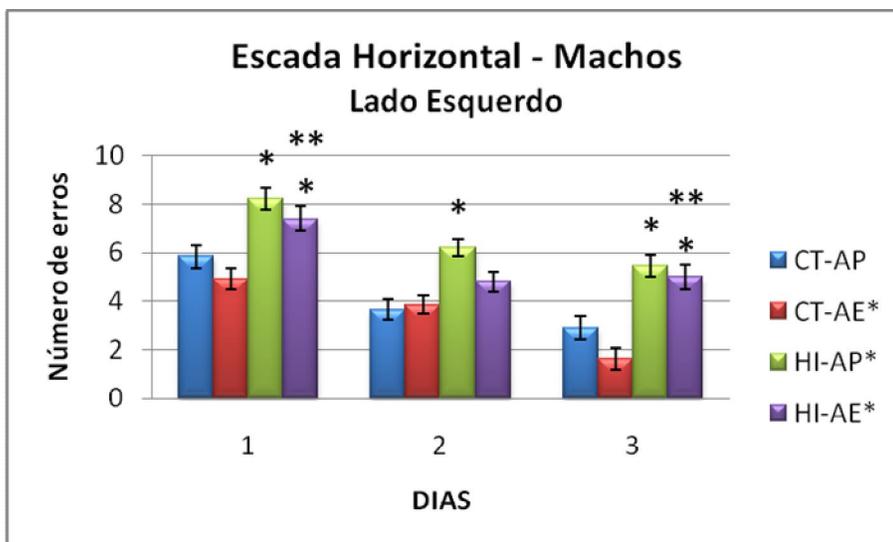
#### 4.2.3 Escada Horizontal

Para análise dos resultados da escada horizontal foi utilizado o teste estatístico ANOVA de medidas repetidas com *post hoc* Duncan. A Figura 25 mostra a soma do número de erros dos membros anterior e posterior esquerdos nos machos no dia (foram feitos 2 sessões de avaliação por dia). O

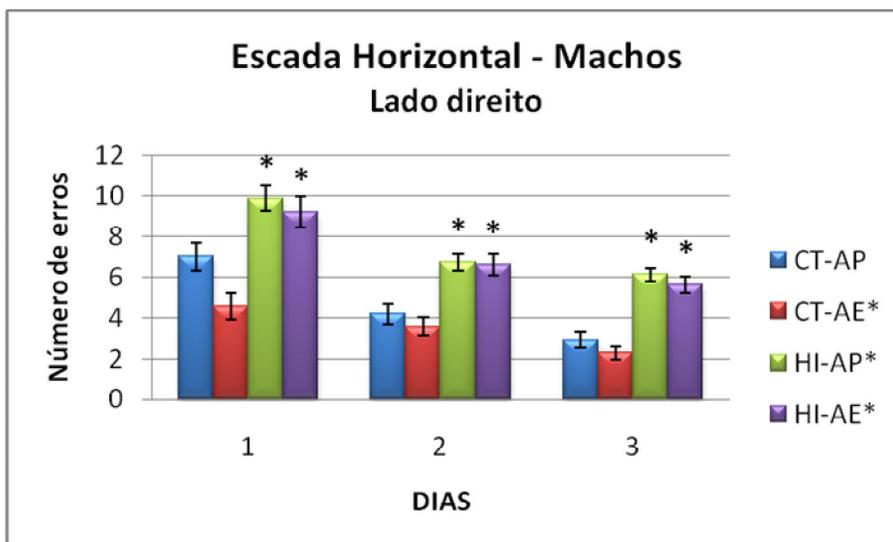
resultado geral da ANOVA mostrou uma diferença significativa na variável lesão ( $F(1,47)=60,3$   $p=0,000$ ) e ambiente ( $F(1,47)=6,4$   $p=0,01$ ). O teste *post hoc* de Duncan indicou uma diferença entre HI-AP com CT-AP nos dias 1 ( $p=0,004$ ), 2 ( $p=0,004$ ) e 3 ( $p=0,003$ ), do HI-AE com CT-AE nos dias 1 ( $p=0,004$ ) e 3 ( $p=0,001$ ) e do HI-AE com CT-AP nos dias 1 ( $p=0,05$ ) e 3 ( $p=0,01$ ). O resultado geral da ANOVA para o número de erros dos membros anterior e posterior direitos (Figura 26) apontou uma diferença na variável lesão ( $F(1,47)=61,6$   $p=0,000$ ) e na variável ambiente ( $F(1,47)=3,98$   $p=0,05$ ). O teste *post hoc* Duncan comprovou esta diferença significativa entre os grupos HI-AP e CT-AP nos dias 1 ( $p=0,009$ ), 2 ( $p=0,02$ ) e 3 ( $p=0,006$ ), entre os grupos HI-AE e CT-AE nos dias 1 ( $p=0,000$ ), 2 ( $p=0,01$ ) e 3 ( $p=0,005$ ) e entre o grupo HI-AE e CT-AP nos dias 1 ( $p=0,05$ ) e 3 ( $p=0,01$ ).

Nas fêmeas, o resultado geral da ANOVA para os erros dos membros anterior e posterior esquerdo (Figura 27), indica uma diferença na variável lesão ( $F(1,35)=50,9$   $p=0,000$ ) e na variável dias X lesão ( $F(2,70)=4,7$   $p=0,01$ ). O teste *post hoc* Duncan mostrou diferenças entre os grupos HI-AP e CT-AP nos dias 1 ( $p=0,02$ ) e 3 ( $p=0,01$ ), HI-AE e CT-AP nos dias 1 ( $p=0,000$ ) e 3 ( $p=0,003$ ), HI-AP com CT-AE nos dias 1 ( $p=0,004$ ), 2 ( $p=0,03$ ) e 3 ( $p=0,007$ ), e entre HI-AE e CT-AE nos dias 1 ( $p=0,000$ ), 2 ( $p=0,05$ ) e 3 ( $p=0,001$ ). Quando analisado os erros dos membros anterior e posterior direitos (Figura 28), a ANOVA mostrou diferença na variável lesão ( $F(1,35)=100,6$   $p=0,000$ ) e ambiente ( $F(1,35)=5,2$   $p=0,02$ ), e o teste *post hoc* Duncan mostrou diferença entre os grupos HI-AP e CT-AP nos dias 1 ( $p=0,000$ ), 2 ( $p=0,001$ ) e 3 ( $p=0,002$ ), entre HI-AE e CT-AE nos dias 1 ( $p=0,001$ ), 2 ( $p=0,000$ ) e 3 ( $p=0,000$ ). Outro resultado interessante, é a diferença entre o grupo HI-AE e

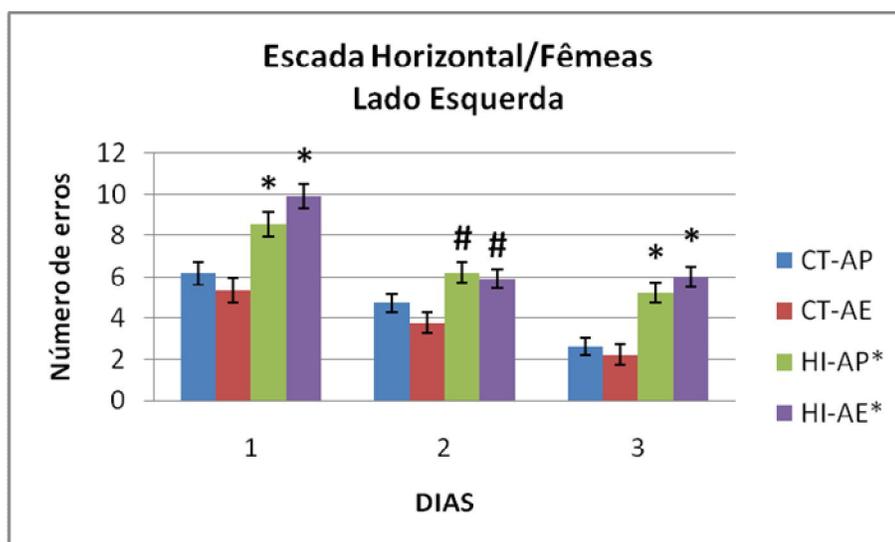
HI-AP no dia 1 ( $p=0,04$ ), mostrando uma melhora no desempenho proporcionada pelo ambiente enriquecido nos ratos pós-lesão.



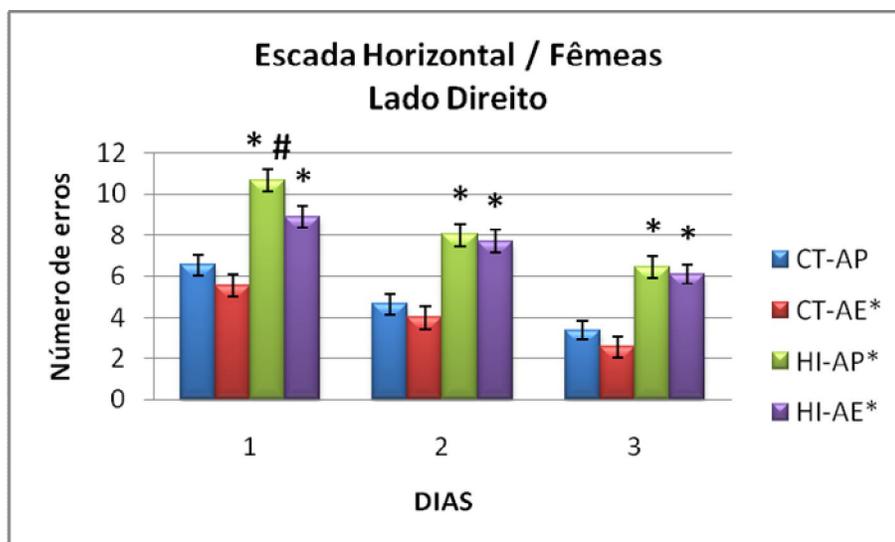
**Figura 25:** Soma do número de erros das patas anterior e posterior esquerda em machos no teste da Escada Horizontal (2 sessões/dia). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*Diferença no resultado geral da ANOVA nas variáveis lesão e ambiente. \*Diferença significativa no *post hoc* Duncan entre grupo HI-AP X CT-AP e HI-AE X CT-AE. \*\*Diferença significativa no *post hoc* Duncan entre HI-AE X CT-AP.



**Figura 26:** Soma do número de erros das patas anterior e posterior direita em machos no teste da Escada Horizontal (2 sessões/dia). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*Diferença no resultado geral da ANOVA na variável lesão e ambiente. \*Diferença no *post hoc* Duncan entre grupo HI-AP e CT-AP./HI-AE e CT-AE.



**Figura 27:** Soma do número de erros das patas anterior e posterior esquerda em fêmeas no teste da Escada Horizontal (2 sessões/dia). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*Diferença no resultado geral da ANOVA na variável lesão. \*Diferença no *post hoc* Duncan entre os grupos HI-AP e CT-AP; HI-AE e HI-AE. # Diferença entre HI-AP e HI-AE com CT-AE.



**Figura 28:** Soma do número de erros das patas anterior e posterior direita em fêmeas no teste da Escada Horizontal (2 sessões/dia). Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \*Diferença no resultado geral da ANOVA nas variáveis lesão e ambiente. \*Diferença no *post hoc* Duncan entre os grupos HI-AP X CT-AP e HI-AE X CT-AE. # Diferença entre HI-AP X HI-AE.

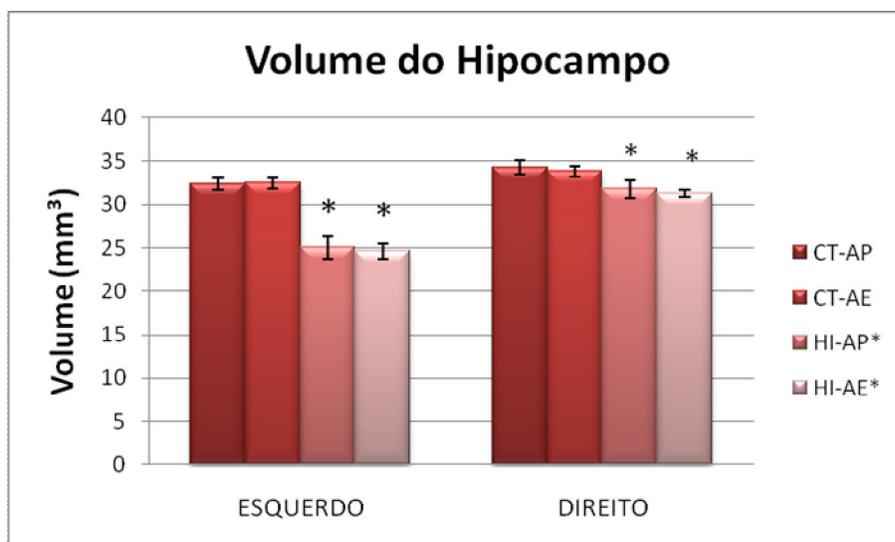
#### 4.2.4. Volume da Lesão

Os dados referentes ao volume da lesão em hipocampo e da área do estriado estão apresentados na Figura 29 e 30. Foi utilizada ANOVA de 2 vias com *post hoc* Duncan para a análise dos dados, com um  $n = 8$  animais/grupo.

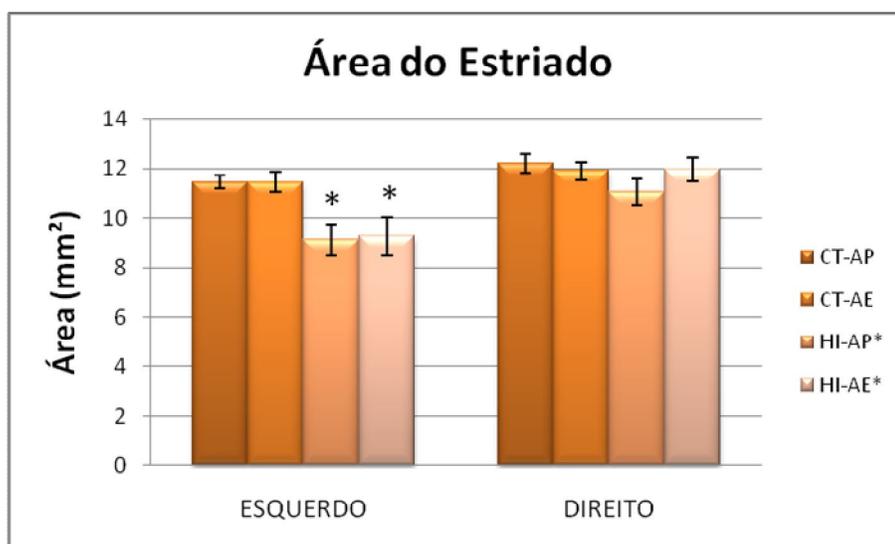
No hipocampo, o resultado geral da ANOVA mostrou uma diferença estatística na variável lesão ( $F(1,29) = 74,8$   $p = 0,0001$ ), também verificada pelo *post hoc* Duncan, mostrando que o volume do hipocampo esquerdo dos animais lesados (HI-AP com  $p = 0,0001$  e HI-AE com  $p = 0,0001$ ) é menor comparado com os animais controle (CT-AP). Isso comprova que houve um

dano promovido pela lesão hipóxico-isquêmica cerebral neonatal, e que este dano não foi recuperado pelo ambiente enriquecido. O hipocampo direito apresentou uma diferença no resultado geral da ANOVA ( $F(1,29)=11,7$   $p=0,01$ ) e o *post hoc* Duncan também verificou que o grupo HI-AP é diferente do CT-AP ( $p=0,03$ ) e o grupo HI-AE é diferente do CT-AE ( $p=0,01$ ). Isto é, os grupos HI possuem um volume hipocampal direito significativamente menor que os grupos controles e o enriquecimento ambiental não recuperou o volume hipocampal direito.

No estriado, o resultado geral da ANOVA indicou uma diferença significativa ( $F(1,29)=16,6$   $p=0,0001$ ) e o *post hoc* de Duncan mostrou que a área do estriado esquerdo dos animais lesados é estatisticamente menor comparada com a área dos grupos controle (HI-AP X CT-AP com  $p=0,009$ ) (HI-AE X CT-AP com  $p=0,01$ ). O insulto hipóxico-isquêmico promoveu uma dano estriatal esquerdo que não foi modificado pelo ambiente enriquecido. O estriado direito não sofreu alterações significativas.



**Figura 29:** Volume hipocampal direito e esquerdo. Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \* Diferença no teste geral da ANOVA na variável lesão. \*Diferença no *post hoc* Duncan entre HI-AP X CT-AP esquerdo, HI-AE X CT-AE esquerdo , HI-AP X CT-AP direito, HI-AE X CT-AE direito .



**Figura 30.** Área estriatal direita e esquerda. Os dados são expressos como média  $\pm$  EP. Os resultados foram analisados por ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . \* Diferença no teste geral da ANOVA na variável lesão. \*Diferença na área do estriado esquerdo entre HI-AP X CT-AP e entre HI-AE X CT-AE.

## **5. DISCUSSÃO**

O presente trabalho teve como objetivo estudar o desenvolvimento as alterações motoras em ratos submetidos à hipóxia-isquemia neonatal (experimento 1), bem como verificar os possíveis benefícios de um protocolo de enriquecimento ambiental como terapêutica experimental (experimento 2). Para tal, estudamos parâmetros comportamentais e morfológicos em animais aos 22 e 42 dias de vida.

### **5.1. Evolução do comprometimento motor em animais submetidos à HIE**

Na primeira parte do trabalho, avaliamos os animais submetidos à lesão HIE neonatal aos 22 dias e aos 42 dias pós-natal, com o intuito de avaliar o comprometimento motor em 2 períodos iniciais pós-lesão.

Com 22 DPN, os animais machos apresentaram uma diferença no deslocamento no teste de suspensão e as fêmeas na latência e no deslocamento no teste de suspensão, sem alterações no teste do RotaRod. Com 42 DPN, os animais machos foram diferentes estatisticamente na latência de queda e no deslocamento no teste de suspensão, na latência de queda no teste do Rota Rod e no número de erros das patas esquerda e direita no teste da caminhada na escada horizontal. As fêmeas apresentaram alterações na latência de queda no teste de suspensão, sem alterações significativas no teste do Rota Rod e um aumento no número de erros das patas esquerda e direita no teste da escada horizontal.

Os resultados histológicos mostraram que a HIE neonatal, em animais com 42DPN, causou uma diminuição significativa no volume hipocampal ipsilateral e contralateral a lesão, assim como uma diminuição na área estriatal ipsilateral a lesão.

Estudos relatam que o dano promovido no modelo de HIE neonatal de Levine/Rice progride com o tempo (CHAN et al., 2009; STONE et al., 2008; KHOT e TIRSCHWELL, 2006). STONE e colaboradores (2008) fizeram um estudo com o objetivo de acompanhar o dano neuronal tardio em ratos submetidos à HIE. Através da análise de imagem por ressonância magnética e análise histológica, avaliaram estruturas encefálicas nos dias 1, 8, 11, 15, 22, 28 e 42 pós-lesão. Correlacionando os achados de imagem com os histológicos, demonstraram que a lesão HIE não é estática, mas avança cronológica e seqüencialmente, levando a uma maior degeneração hipocampal.

Trabalhos anteriores do nosso laboratório utilizando o mesmo modelo de lesão HIE, corroboram com estes resultados, mostrando uma diminuição significativa no volume hipocampal e na área cortical ipsilateral à lesão (RODRIGUES et al., 2004; PEREIRA et al., 2007; ARTENI et al., 2010).

MISHIMA e colaboradores (2005) descreveram que a encefalopatia fetal e neonatal promovem dano progressivo na memória e no aprendizado, verificado através de diferentes testes de memória e aprendizado (Labirinto aquático de Morris, Labirinto Radial, Labirinto em Cruz Elevado). Através de exames de imagem por ressonância magnética e por análise histológica, verificaram que o dano da HIE neonatal continua afetando o desenvolvimento

neuronal, estrutural e funcional. Na quinta semana de recuperação pós-lesão, uma diferença significativa já se mostrava no hipocampo dorsal ipsilateral à lesão e só na nona semana esta diferença era visualizada no hipocampo contralateral. Assim, concluíram que o dano encefálico, analisado pela histologia e por testes de memória e aprendizado, era lentamente e progressivamente exacerbado com o passar do tempo, primeiramente lesando o hemisfério ipsilateral e tardiamente comprometendo também o hemisfério contralateral, após HIE neonatal.

QUAIRIAUX e colaboradores (2010) avaliaram através de mapeamento por médias de potências sensoriomotores evocados epicraniais, os efeitos funcionais durante o período de recuperação pós-HIE. Como resultado viram que os dois hemisférios cerebrais continuavam com potenciais deprimidos na região sensorial até o dia 21 pós-lesão, concluindo que a HIE levou a desorganização dos padrões de sinais do córtex sensoriomotor sem alterações histológicas. Mudanças após HIE na expressão de citocinas, HIF1-alpha e P-Akt são verificadas tanto no hemisfério ipsilateral como contralateral, porém o dano neuronal foi somente ipsilateral à lesão (VAN DEN TWEEL et al., 2006)

Os hemisférios cerebrais, assim como as regiões da substância branca e cinzenta, não são compartimentos isolados, mas elementos funcionais do SNC (SULLIVAN et al., 2010). Corpos de células de um hemisfério podem ter axônios com projeções até outro hemisfério, portanto um dano no desenvolvimento do hemisfério ipsilateral impactará nas suas projeções no hemisfério contralateral à lesão.

Para melhor entender as consequências dessas alterações, estudos experimentais são fundamentais. O comprometimento congênito já está bem caracterizado, porém as alterações motoras ainda não. JANSEN e LOW (1996) realizaram um estudo avaliando os efeitos ao longo prazo da HIE neonatal em tarefas sensório-motoras e locomotoras. Uma análise histológica do estriado, córtex sensório-motor e hipocampo foi feita, além de uma análise comportamental, através do teste Rota Rod. Como resultado, os animais apresentaram diminuição da área estriatal, do córtex sensório-motor e do hipocampo dorsal ipsilateral a lesão, além de um pior desempenho em todas as avaliações motoras, da 3<sup>o</sup> até a 9<sup>o</sup> semana de idade.

As evidências dessas alterações motoras são demonstradas quando testes específicos, que exigem uma maior habilidade e força, são utilizados. Os testes de reflexos posturais (BONA et al., 1997), teste de coordenação e equilíbrio como Rota Rod e escada horizontal (JANSEN e LOW, 1996; LIU et al., 2006), observações sobre comportamento motor no teste do campo aberto (GIRARD et al., 2009) e avaliação da força no teste de suspensão pelas patas anteriores (PAZAITI et al., 2009), são metodologias de avaliação mais refinadas para déficits sensório-motores provocados pela lesão hipóxica isquêmica cerebral neonatal.

O teste de suspensão na barra foi proposto para verificar a força por meio da latência de queda e a coordenação através do deslocamento pela barra. Adotamos o mesmo protocolo utilizado por PAZAITI e colaboradores (2009), acrescentando à variável deslocamento. As fêmeas do grupo 42DPN não apresentaram alterações neste teste, porém os machos HIE tiveram desempenho significativamente inferior na variável latência de queda e

deslocamento pela barra. No experimento 2, quando repetimos este teste, as fêmeas HIE com 42DPN novamente não apresentaram diferenças entre os grupos (para latência de queda), e os machos novamente apresentaram alterações significativas no grupo HIE na latência para queda e no deslocamento pela barra. Estes dados nos sugerem que a alteração motora em machos e em fêmeas submetidos à HIE é diferenciada, com um discreto comprometimento maior em machos.

Tendo em vista os resultados mostrando as diferenças motoras proporcionadas pelo gênero, salientamos a importância desta variável como uma possível influenciadora no resultado final de futuros estudos. Outra importante variável é o tempo de lesão HIE, que pode ser capaz de modificar o comportamento motor. Conforme nossos resultados sugerem, houve diferenças nos desempenhos motores de animais com 22DPN e 42DPN. Este dado se atribui à direta relação entre o maior tempo de lesão e o maior dano ao encéfalo, comprometendo assim as estruturas responsáveis pelo controle motor (MISHIMA et al., 2005; ARTENI et al., 2010). Estudos mostram uma diferente vulnerabilidade neuronal pós-lesão hipóxica isquêmica encefálica neonatal. Inicialmente, o hipocampo é a estrutura mais susceptível à lesão por HIE, e mais tardiamente, o córtex e o estriado também são comprometidos (STONE et al., 2008; JIANG et al., 2004).

A utilização do teste da caminhada na escada horizontal como um meio de mensurar déficits motores foi proposto por METZ e WHISHAW (2002). O estudo mostra que este teste pode ser utilizado para avaliar a função dos membros anteriores e posteriores de animais com lesão unilateral no córtex motor, com depleção de dopamina na via nigroestriatal e lesão no tracto

córtico-espinhal. O resultado indica que o teste da caminhada na escada horizontal é um teste sensível para quantificar a habilidade nos movimentos de locomoção (METZ e WHISHAW, 2001; METZ E WHISHAW, 2002; FARR e cols., 2006). Não há estudos prévios avaliando o comportamento motor no teste da caminhada na escada horizontal de animais submetidos à lesão hipóxica isquêmica neonatal. Este é o primeiro trabalho utilizando este teste para avaliar animais com 22DPN e 42DPN submetidos a um modelo de HIE neonatal.

No teste da escada horizontal, os resultados mostraram que os ratos machos e fêmeas HIE, avaliados com 42DPN (experimento 2), tiveram uma maior quantidade de erros quando comparados com os animais controle, tanto com as patas ipsilaterais como contralaterais à lesão, afetando o controle motor de todo corpo. Estes achados corroboram com os de FARR e colaboradores (2005) que, com um modelo de isquemia focal no córtex motor de ratos, verificou um comportamento falho e compensatório no lado ipsilateral e contralateral da lesão.

Outro aparato muito utilizado para testar a coordenação motora é o Rota Rod. Trata-se de uma boa ferramenta para análise de alterações químicas e estruturais envolvidas no controle motor. PAZAITI e colaboradores (2009) avaliaram as conseqüências sensório-motoras em ratos submetidos à lesão hipóxica isquêmica neonatal utilizando o Rota Rod. Perceberam que os animais lesados tiveram um pior desempenho permanecendo menos tempo equilibrados sobre o cilindro.

Alguns dados são importantes de ressaltar no estudo de PAZAITI e colaboradores (2009). O aparelho Rota Rod utilizado possuía um aumento gradativo da velocidade, iniciando com 4rpm e avançando até 40rpm, isto é, uma aceleração de 4rpm/min. Os resultados de animais avaliados com 42DPN mostraram que o grupo que sofreu o dano HIE permaneceu por menos tempo equilibrado sobre o cilindro, quando comparado ao grupo controle. Esses mesmos achados são observados no estudo de GIRARD e colaboradores (2009) que utilizando o mesmo protocolo de teste, mostrou diferenças significativas em ratos lesados a partir do 35DPN.

No experimento 1, os animais com 22DPN não apresentaram diferença significativa no teste do Rota Rod. Tanto os machos como as fêmeas apresentaram desempenho motor similar. Não foram encontrados trabalhos prévios analisando o comportamento motor no Rota Rod de ratos com 22DPN submetidos ao modelo de lesão de HIE. Estes são os primeiros resultados mostrando que o comprometimento motor ainda não é aparente nessa idade. Na avaliação dos animais com 42 dias de vida, somente os machos apresentaram diferença significativa.

No experimento 2, os animais machos apresentaram uma diferença significativa, onde os submetidos à HIE permaneceram por menos tempo sobre o cilindro do Rota Rod no 2º e 3º dia de teste (conforme *post hoc* de Duncan). Nas fêmeas, novamente não houve diferença quanto ao tempo de permanência sobre o Rota Rod.

Por não apresentar modificações motoras grosseiras (significativas estatisticamente), as fêmeas podem estar desempenhando gestos motores

deficitários, sem sinergia muscular e controle postural adequados, porém capazes de proporcionar a função necessária para tarefa. Mecanismos compensatórios de movimento podem estar sendo utilizados na tentativa de contrabalançar as limitações sensoriomotoras provenientes da lesão cortical. Os animais podem estar executando movimentos sem qualidade e com maior esforço muscular no intuito de suprir os danos motores, e assim, mascarando alterações motoras qualitativas. Esta análise qualitativa não era objetivo do estudo e poderá ser relevante para os próximos trabalhos.

Apesar de muitos dos trabalhos citados não considerarem o sexo dos animais como variável relevante, diferenças de gênero em relação ao tamanho da lesão morfológica e ao comportamento são descritas na literatura. Fatores relacionados ao gênero podem influenciar tanto a incidência como o tipo de lesão encefálica neonatal. Dados epidemiológicos evidenciam que bebês do sexo masculino são mais vulneráveis que os do sexo feminino, acarretando um número maior de portadores de paralisia cerebral em meninos (REISS et al., 2004).

Nos estudos experimentais essas diferenças de gênero também são observadas. ARTENI e colaboradores (2010) publicaram um estudo investigando os efeitos do gênero e do hemisfério lesado pelo modelo de hipóxia isquemia neonatal proposto por Levine-Rice. Houve uma diferença comportamental sexo-dependente nos ratos, sendo que as fêmeas apresentaram maior deambulação espontânea e os machos um melhor desempenho em testes espaciais. A mensuração morfológica apresentou dados comparativos importantes. As fêmeas apresentaram menor volume hipocampal e área estriatal quando comparadas com os machos. O estriado

direito sofreu maior atrofia em fêmeas comparado com machos. O dano estriatal direito foi maior com oclusão da artéria carótida ipsilateral comparada ao dano estriatal esquerdo com a oclusão da artéria carótida esquerda.

Algumas pesquisas são feitas analisando a influência hormonal na recuperação de lesões do sistema nervoso central (MCCULLOUGH e HURN, 2003; LI et al., 2004). O estrogênio é um importante agente neuroprotetor que, quando administrado pode reduzir o dano tecidual pós lesão (MCCULLOUGH e HURN, 2003). Li e colaboradores (2004) demonstraram que a administração de estrogênio promoveu melhora no desempenho sensório-motor no teste do cilindro, em ratos submetidos a um modelo de lesão de isquemia focal.

CIMAROSTI e colaboradores (2005) apresentaram um estudo sugerindo que, num modelo de isquemia in vitro, a neuroproteção por estrógeno pode envolver a via de sinalização celular da fosfatidil inositol 3-quinase (PI3-K), a prevenção do dano oxidativo a proteínas e a regulação dos receptores estrogênicos ER $\alpha$  e ER $\beta$ , enquanto que a tolerância à isquemia cerebral induzida por pré-condicionamento pode envolver a regulação dos transportadores de glutamato EAAT2 e receptores estrogênicos ER $\alpha$ .

A lateralização também pode ser um fator importante na análise do comportamento motor. Trabalhos prévios mostram a preferência motora pela pata direita em ratos, assim como em humanos (PAZAITI et al., 2009). Então, uma lesão HIE à esquerda promoveria um maior déficit motor em tarefas de habilidade por lesar o córtex motor que controla o membro dominante.

Os resultados do teste da escada horizontal mostraram que houve um comprometimento bilateral no padrão de locomoção, sendo o lado esquerdo, ipsilateral à lesão, levemente menos afetado que o direito.

BUDILIN e colaboradores (2007) demonstraram a correlação entre os níveis de dopamina no Núcleo Accumbens com a assimetria na preferência da pata anterior. A preferência do membro era demonstrada através da resposta da retirada do alimento de um tubo horizontal. Os resultados mostram que os níveis de dopamina são maiores no Núcleo Accumbens do lado ipsilateral à preferência motora. Isto é, animais com preferência pela mão direita para a tarefa apresentaram maior concentração de dopamina no Núcleo Accumbens direito. Este fato sugere que o dano cortical direito causa maior alteração motora. Mais estudos relacionados à lateralização com modelos de lesão são necessários para melhor entendimento dos comprometimentos e dos mecanismos envolvidos na definição da dominância motora.

Todos os resultados apresentados até então fazem do modelo de HIE de Levine/Rice um bom modelo de estudo, pois as alterações motoras apresentadas são condizentes com as alterações encontradas na clínica em crianças portadoras de paralisia cerebral. O tratamento e a evolução motora do recém-nascido são dependes da maturação do Sistema Nervoso Central (SNC) que é determinada por padrões geneticamente estabelecidos e por estímulos ambientais (FLEHMIG, 1987).

## **5.2. Efeito do Enriquecimento Ambiental**

Por possuir um sistema nervoso imaturo e em desenvolvimento, a resposta à lesão no cérebro do neonato é diferente do cérebro adulto,

sugerindo que neurônios imaturos são mais suscetíveis à morte, pelo fato de estarem em constante desenvolvimento e necessitarem de um bom aporte cerebrovascular para isso (YAGER et al., 2004; MCLEAN e FERRIERO, 2004).

Assim, a gravidade das lesões está diretamente relacionada com a idade gestacional, tempo de duração e severidade, alterando a neurogênese, migração, mielinização, morte celular e a sinaptogênese (AYLWARD et al., 2005). Por outro lado, este microambiente em constante modificação, quando devidamente estimulado, propicia maiores possibilidades de modulação e adaptação frente a uma lesão (IKEDA, 2008).

Numerosos estudos são dedicados a estratégias de tratamento e intervenções neuroprotetoras que possam interferir na cascata de eventos desencadeada pela HIE. O ambiente é uma importante ferramenta no processo de reabilitação da lesão HIE neonatal, capaz de melhorar as habilidades motoras, cognitivas e psicossociais (HALLAL, MARQUES e BRACCIALLI; 2008).

No presente estudo, o enriquecimento ambiental promoveu um efeito neuroprotetor sobre as alterações motoras de ratos submetido à HIE neonatal. Houve um efeito positivo na reversão parcial no teste de suspensão na barra, nos ratos machos. O grupo HI-AE foi igual ao controle na latência de queda e no deslocamento pela barra, variáveis que o grupo HI-AP foi significativamente diferente. No teste do RotaRod, um aprendizado foi verificado pelo tempo de permanência ser gradativamente maior com o passar das sessões, em ratas submetidas HIE sob protocolo de enriquecimento ambiental. Dado este não observado nos animais HIE de ambiente padrão, nem em machos submetidos

ao ambiente enriquecido. Isto indica a possibilidade do ambiente enriquecido ter facilitado o aprendizado das ratas fêmeas. No teste da escada horizontal, houve um efeito do ambiente enriquecido no primeiro dia, onde apareceu uma diferença significativa entre o grupo HI-AP e HI-AE. As ratas fêmeas demonstraram um melhor desempenho na coordenação das patas da direita, consequência da exposição repetida às possibilidades de treinamento do ambiente enriquecido.

O enriquecimento ambiental é bastante estudado como estratégia terapêutica para reabilitação e envolve uma combinação de interação social, exercício físico e uma contínua exposição a tarefas de aprendizagem, onde os animais permanecem num local rico em estímulos sensoriais, cognitivos e motores. Este ambiente proporciona uma melhora da neurogênese (HICKS et al., 2007), da sinaptogênese (DUFFY et al., 2001), da plasticidade neuronal hipocampal e, conseqüentemente, melhora nas tarefas de aprendizado e memória (PEREIRA et al., 2007).

Nosso laboratório vem estudando os benefícios desta intervenção há algum tempo. PEREIRA e colaboradores (2007) desenvolveram um protocolo de enriquecimento ambiental diário, ratos a partir do 22DPN até a 9ª semana, durante 6 dias/semana, 1 hora/dia em grupos de 7-10 animais, eram expostos há uma gaiola com 3 pisos, rampas, rodas de corrida e vários objetos com diferentes texturas, formas e sons. Para avaliar os benefícios desta intervenção, foi utilizado uma análise morfológica e o teste de memória do labirinto aquático de Morris. O enriquecimento ambiental foi capaz de reverter o déficit de memória em ratos submetidos à lesão HIE neonatal, sem efeito na perda do volume neuronal hipocampal e área cortical.

Em outro estudo, um novo protocolo de enriquecimento ambiental iniciando no 8º DPN, 1º dia após lesão HIE, foi testado. O enriquecimento ambiental precoce foi capaz de melhorar a performance no teste de reconhecimento de objetos e promover uma recuperação parcial no teste de memória de trabalho em ratas fêmeas adolescentes pós-HIE, benefício não conquistado em machos. Este artigo apresentou resultados sugerindo que as fêmeas podem ser mais estimuladas pelo ambiente enriquecido que os machos (PEREIRA et al., 2008). ZAGRON e WEINSTOCK (2006) relatam que é importante considerar que o estresse inerente à novidade proporcionado pelo estímulo ambiental tem maior impacto sobre os ratos machos.

Resultados apresentados anteriormente mostraram uma alteração motora diferenciada entre ratos machos e fêmeas. SAUCIER e colaboradores (2010) também sugerem uma diferença de gênero no processo de reabilitação sensoriomotora proporcionada pelo ambiente enriquecido. Os resultados mostraram que o ambiente enriquecido proporcionou uma melhora na performance motora em ratos machos, mas não em fêmeas.

Os efeitos neurobiológicos do ambiente enriquecido se devem a modificações que promovem um aumento da plasticidade e neurogênese. Na tentativa de entender melhor os mecanismos que o enriquecimento pode estar influenciando, foi feito um estudo analisando o estado oxidativo e os níveis de BDNF em hipocampo e córtex de ratos submetidos à HIE neonatal. O protocolo de enriquecimento ambiental capaz de proteger contra perda cognitiva não foi associado à expressão de BDNF nem a atividade de SOD (super oxidodismutase) (PEREIRA et al., 2009).

CHEN e colaboradores (2005) encontraram dados de aumento de BDNF hipocampal em fêmeas estimuladas pelo enriquecimento ambiental, mas este padrão não apareceu nos machos. BAKOS e colaboradores (2009) mostraram a influencia do ambiente enriquecido nos níveis plasmáticos de aldosterona, testosterona e ocitocinas. As mudanças na plasticidade cerebral foram atribuídas ao aumento da concentração de BDNF no hipocampo, mais pronunciado em fêmeas. O AE promoveu uma diminuição dos níveis de aldosterona e ocitocinas em ratas fêmeas, e um aumento dos níveis de testosterona e (ACTH) em ratos machos. Os resultados sugerem então, que a testosterona pode exercer uma discreta influência regulatória gênero-dependente no processo relacionado à neuroplasticidade.

Além desses dados, a interação afetiva e social é determinante para o desenvolvimento psicológico e emocional. Estímulos ambientais sociais precoces podem promover diferenças no comportamento social adulto modificando níveis de neurotrofina e em regiões cerebrais, como hipocampo e hipotálamo (BRANCHI et al., 2005). Estas modificações levam a uma melhora nos testes de ansiedade, como no Plus Maze (CIRULLI et al., 2010). Modificações emocionais envolvem diretamente as estruturas do sistema límbico capazes de influenciar diretamente o desempenho motor.

Trabalhos mostram um impacto positivo do enriquecimento ambiental em animais submetidos à modelo de síndrome de RETT. Achados mostram que o enriquecimento melhorou a coordenação motora em fêmeas, mas não em machos (KONDO et al., 2008). Em animais submetidos a um modelo de esclerose lateral amiotrófica, fêmeas submetidas ao enriquecimento apresentaram melhor performance motora mensurada pela aceleração maior

no teste do Rota Rod, diferente do machos (STAM et al., 2008). Em outro estudo, o ambiente enriquecido reduziu o volume ventricular, com correlação na melhora da atividade locomotora no teste do Rota Rod, sugerindo que mudanças neuroanatomicas contribuem para uma melhora no desempenho comportamental (NAG et al., 2009).

Com base nos estudos e resultados apresentados, o ambiente enriquecido mostrou ser capaz de proporcionar muitas mudanças benéficas ao SNC. A pesquisa básica experimental sempre visa à aplicabilidade nos trabalhos clínicos e o enriquecimento ambiental é uma estratégia barata e de fácil aplicabilidade que demonstrou ser muito importante no processo de recuperação das alterações neuropsicomotoras da criança. É um recurso complementar ao tratamento proposto pela fisioterapia, podendo ser implementado nas casas, creches e escolas para que a criança possa usufruir o máximo de tempo possível de estímulos benéficos para ter uma melhor reabilitação.

## 6. Conclusões

1. Não foram verificadas alterações motoras nos testes de suspensão e no Rota Rod em animais machos com 22DPN submetidos à HIE neonatal, porém com 42DPN apresentaram alterações motoras no teste de suspensão e no Rota Rod;

2. As fêmeas submetidas à HIE neonatal não apresentaram alterações motoras nos testes de suspensão e no Rota Rod nem com 22DPN nem com 42DPN, mas apresentaram com 42DPN no teste da caminhada na escada horizontal.

3. O enriquecimento ambiental promoveu uma recuperação parcial dos déficits motores em ratos machos quanto à latência de queda no teste da barra; e recuperou o dano causado pela HIE em ratas fêmeas no 1º dia do teste da caminhada na escada horizontal;

4. As ratas fêmeas apresentaram um melhor aproveitamento do ambiente enriquecido que lhes proporcionou uma melhor performance no teste da caminhada na escada horizontal e uma curva de aprendizado no teste Rota Rod;

5. A exposição ao enriquecimento ambiental não alterou a extensão das lesões morfológicas hipocampal e estriatal após a hipóxia-isquemia neonatal.

## 7. Referenciais Bibliográficos

AMATO, M.; FILIPPO, D. Update on Perinatal Hypoxic Insult: Mechanism, Diagnosis and Interventions. *European Paediatric Neurology Society*, Vol. 4: 203-209, 2000.

ARTENI, N.S.; PEREIRA, L.O.; RODRIGUES, A.L.; LAVINSKY, D.; ACHAVAL, M.E.; NETTO, C.A. Lateralized and sex-dependent behavioral and morphological effects of unilateral neonatal cerebral hypoxia-ischemia in the rat. *Behavioural Brain Research*. Vol. 210: 92-98. 2010.

AYLWARD, G. Neurodevelopmental Outcomes of Infants Born Prematurely. *Developmental and Behavioral Pediatrics*, Vol.6, nº 6, 2005.

BIERNASKIE, J. e CORBETT, D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *The Journal of Neuroscience*. Vol 21:5272-5280, 2001.

BRANCHI, I.; D'ANDREA, I.; FIORE, M.; Di FAUSTO, V.; ALOE, L.; ALLEVA, E. Early social enrichment shapes social behavior and nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor levels in the adult mouse brain. *Biological Psychiatry*. Vol. 60: 690-696, 2006.

BONA, E.; JOHANSSON, B.B.; HAGBERG, H. Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats. *Pediatric Research*. Vol 42: 678-83, 1997.

BUDILIN, S.L.U.; MIDZIANOVSKAIA, I.S.; SHCHEGOLEVSKII, N.V.; IOFFE, M.E.; BAZIAN, A.S. Asymmetry in the dopamine content in the nucleus accumbens and the motor preference in rats. *Zhurnal Visshey Nervnoi Deiatelnoisti Imeni IP Pavlova*. Vol. 57: 598-603, 2007.

CARAM, L.H.; FUNAVAMA, C.A.; SPINA, C.I.; GIULIANI, L.R.; De PINA NETO, J.M. Investigation of neurodevelopment delay etiology: resources and challenges. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*. Vol 64: 466-72, 2006.

CHAN, K.C.; KHONG, P.I.; LAU, H.F.; CHEUNG, P.; WU, E. Late measures of microstructural alterations in severe neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy by MR diffusion tensor imaging. *International Journal of Developmental Neuroscience*. Vol.27: 607-615, 2009.

CIMAROSTI, H.; SIQUEIRA, I. R.; ZAMIN, L. L.; NASSIF, M.; BALK, R.; FROZZA, R.; DALMAZ, C.; Netto, C.A.; SALBEGO, C. Neuroprotection and Protein Damage

Prevention by Estradiol Replacement in Rat Hippocampal Slices Exposed to Oxygen-Glucose Deprivation. *Neurochemical Research* Vol. 30:583-589, 2005.

DUFFY, S.N.; CRADDOCK, K.J.; ABEL, T.; NGUYEN, P.V. Environmental enrichment modifies the PKA-dependence of hippocampal LTP and improves hippocampus-dependent memory. *Learn Memory*, Jan-Feb;8(1):26-34, 2001.

EDELMUTH, C E. Pessoas portadoras de deficiência. A realidade brasileira. *Departamento de Educação Especial da Secretaria de Educação Fundamental do MEC.*; Vol. 10: 8-9, 1992.

FARR, T.D.; LIU, L.; COLWELL, K.L.; WISHAW, I.Q.; METZ, G.A. Bilateral Alteration in stepping pattern after unilateral motor cortex injury: a new test strategy for analysis of skill limb movements in neurologic mouse models. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 153: 104-113, 2006.

GIRARD, S.; KADHIM, H.; BREAUDET, N.; SARRET, P.; SEBIRE, G. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: a novel animal model for cerebral palsy in very premature infants. *Neuroscience*, Vol. 158:673-682, 2009.

HALLAL, C.Z.; MARQUES, N.R.; BRACCIALLI, L.M.P. Aquisição de Habilidades Funcionais na Área de Mobilidade em Crianças Atendidas em um Programa de Estimulação Precoce. *Revista Brasileira de Crescimento Desenvolvimento Humano*. Vol.18(1): 27-34, 2008.

HICKS, A.U.; HEWLETT, K.; WINDLE, V.; CHERNENKO, G.; PLOUGHMAN, M.; JOLKKONEN, J.; WEISS, S.; CORBETT, D. Enriched environment enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke. *Neuroscience*, Vol. 146(1): 31-40, 2007.

IKEDA, T.; MISCHIMA, K.; YOSHIKAWA, T.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M.; XIA, Y. X.; IKENOUE, T. Selective and long-term learning impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Behavioural Brain Research*, Vol. 118: 17-25, 2001.

IKEDA, T. Stem cells and neonatal brain injury. *Cell and Tissue Research*, Vol. 331: 263-269, 2008.

IKEDA, T.; MISHIMA, K.; AOO, N.; HARADA, K.; LIU, A.X.; EGASHIRA, N.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M.; IKENOUE, T. Rehabilitative training tasks improve spatial learning impairment in the water maze following hypoxic-ischemic insult in neonatal rats. *Pediatric Research*, Vol. 59(1): 61-5, 2006.

JANSEN, E.M.; LOW, W.C. Long-Term Effects of Neonatal Ischemic-hypoxic Brain Injury on Sensorimotor and Locomotor Tasks in Rats. *Behavioural Brain Research*, Vol. 78:189-194, 1996.

JIANG, X.; MU, D.; MANABAT, C.; KOSHY, A.A.; CHRISTEN, S.; TAUBER, M.G.; VEXLER, Z.S.; FERRIERO, D.M. Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation. *Experimental Neurology*, Vol. 190:224-232, 2004.

JOHNSTON, M.V.; HOON, A.H. Cerebral Palsy. *NeuroMolecular Medicine*, Vol.8: 435-450, 2006.

KHOT, S.; Tirschwell, D.L. Long-term neurological complications after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Seminars in Neurology*, Vol. 26(4):422-431, 2006.

KOLB, B., WHISHAW, I.Q. Brain plasticity and behavior. *Annual Review of Psychology*. Vol. 49: 43-64, 1998.

KONDO, M.; GRAY, L.J.; PELKA, G.J.; CHRISTIDOULOU, J.; TAM, P.P.; HANNAN, A.J. Environmental enrichment ameliorates a motor coordination deficit in a mouse model of Rett syndrome--Mecp2 gene dosage effects and BDNF expression. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 27(12):3342-50, 2008.

KOHZUKI, M.; TOMIMATSU, T.; FUKUDA, H.; KANAGAWA, T.; KANZAKI, T.; SHIMOYA, K.; MURATA, Y. Long-term neuroprotective effects of carbon dioxide on neonatal rat hypoxic-ischemic brain injury: an experimental study of skilled motor tasks. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, Vol. 195(1):240-5, 2006.

LEONARDO, C.C.; PENNYPACKER, K.R. Neuroinflammation and MMPs: potential therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic injury. *Journal of Neuroinflammation*, Vol. 6: 13, 2009.

LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *American Journal of Pathology*, Vol. 36: 1-17, 1960.

LI, X.; BLIZZARD, K.K.; ZENG, Z.; DEVRIES, A.C.; HUM, P.D.; MCCULLOUGH, L.D. Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender. *Experimental Neurology*. Vol. 187(1):94-104, 2004.

LIU, Z.M.D.; YANG FAN, M.S.; SEOK JOON, W.; NEUMANN, M.; HU, D.; ZHOU, L.; WEINSTEIN, P.R.; LIU, J. Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke*, Vol. 38: 146-152, 2007.

LIU, C.L.; LIN, Y.R.; CHAN, M.H.; CHEN, H.H. Effects of toluene exposure during brain growth spurt on GABA(A) receptor-mediated functions in juvenile rats. *Toxicological Sciences*, Vol. 95(2):443-451, 2007.

LUBICS, A.; REGLODI, D.; TAMAS, A.; KISS, P.; SZALAI, M.; SZALONTAY L. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioral Brain Research*, Vol.157:157-165, 2005.

MAGISTRETTI, P.J.; PELLERIN L.; RTHMAN, D.L.; SHULMAN, R.G. Energy on demand. *Science*. Vol. 283:.486-487, 1999.

MCCULLOUGH, L.D.; HURN, P.D. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends in Endocrinology and Metabolism*.Vol 14(5): 228-35, 2003.

MCLEAN, C.; FERRIERO, D. Mechanisms of Hypoxic-Ischemic Injury in the Tern Infant. *Semin Perinatology*. Vol. 28: 425-432, 2004.

METZ, G.A.; WHISHAW, I.Q. Drug-induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. *Neuroscience*. Vol. 111(2): 325-36, 2002.

METZ, G.A.; WHISHAW, I.Q. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping,placing, and co-ordination. *Journal of Neuroscience Methods*, Vol. 115:169-179, 2002.

MISHIMA, K.; IKEDA, T.; AOO, N.; TAKAI, N.; TAKAHASHI, S.; EGASHIRA, N.; IKENOUE, T.; IWASAKI, K.; FUJIWARA, M. Hypoxia-ischemic insult in neonatal rats induced slowly progressive brain damage related to memory impairment. *Neuroscience Letters*, Vol. 376(3): 194-9, 2005.

NAG, N.; MORIUCHI, J.M.; PEITZMAN, C.G.; WARD, B.C.; KOLODNY, N.H.; BERGER-SWEENEY, J.E. Environmental enrichment alters locomotor behaviour and ventricular volume in Mecp2 1lox mice. *Behavioural Brain Research*. Vol. 96(1):44-8, 2009.

NELSON, K.B. The epidemiology of cerebral palsy in term infants. *Mental Retard Development Disability Research* Vol. 8:146, 2002.

NELSON, K.B.; ELLENBERG, I.H. Epidemiology of cerebral palsy. *Advances in Neurology*, Vol.19:421-35, 1978.

PAZAITI, A.; SOUBASI, V.; SPANDOU, E.; KARKAVELAS, G.; GEORGIU, T.; KARAKIS, P.; GUIBA-TZIAMPURI, O. Evaluation of Long-Lasting Sensorimotor Consequences following Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Rats: The Neuroprotective Role of MgSO<sub>4</sub>. *Neonatology*. Vol.95: 33-40, 2009.

PAXINOS, G. E WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates (2<sup>a</sup> edição). Sydney: *Academic Press*, 1986.

PEREIRA, L O.; ARTENI, N S.; PETERSEN, R C.; ROCHA, A P.; ACHAVAL, M.; NETTO, C A. Effects of Daily Environmental Enrichment on Memory Deficits and Brain Injury Following Neonatal Hypoxia-ischemia in the Rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, Vol.87(1):101-8, 2007.

PEREIRA, L.O.; STRAPASSON, A.C.P.; NABINGER, P.M.; ACHAVAL, M.; NETTO, C.A. Early enriched housing results in partial recovery of memory deficits in female, but not in male, rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Research*, Vol. 1218: 257-266, 2008.

PEREIRA, L.O.; NABINGER, P.M.; STRAPASSON, A.C.; NARDIN, P.; GONÇALVES, C.A.; SIQUEIRA, I.R.; NETTO, C.A. Long-term effects of environmental stimulation following hypoxia-ischemia on the oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus and frontal cortex. *Brain Research*, Vol. 1247:188-95, 2009.

PERLMAN, J.M. Brain injury in the term infant. *Seminars in Perinatology*, Vol. 28(6): 415-24, 2004.

QUAIRIAUX, C.; SIZONENKO, S.V.; MÉGEVAND, P.; MICHEL, C.M.; KISS, J.Z. Functional deficit and recovery of developing sensorimotor networks following neonatal hypoxic-ischemic injury in the rat. *Cerebral Cortex*. January 4, 2010.

REISS, A L; KESLER, S R; VOHR, B; DUNCAN, C; Katz, k; PAJOT, S; SCHNEIDER, K C; MAKUCH, R W; MENT, L R. Sex differences in cerebral volumes of 8-years-old born preterm. *Journal of Pediatric*, Vol.145: 242-249, 2004.

RICE, J. E.; VANNUCCI, R. C.; BRIERLEY, J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of Neurology*, vol. 9: 131–141, 1981.

RODRIGUES, A. L.; ARTENI, N. S.; ABEL, C.; ZYLBERSZTEJN, D.; CHAZAN, R.; VIOLA, G. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Research*. Vol. 1002: 94–99, 2004.

ROTTA, N T. Cerebral palsy, new therapeutic possibilities. *Journal Pediatric (RIO)*, vol. 78: 48-54, 2002.

SAUCIER, D.M.; YAGER, J.Y.; ,ARMSTRONG, E.A. Housing environment and sex affect behavioral recovery from ischemic brain damage. *Behavioural Brain Research*. Vol. 29, 2010.

SHENG, N.; LUAN, S.J.; QIN, H.P. Approach to and effectiveness of environmental risk education of public: case of indoor environmental risk consciousness in beijing. *Environmental Science*, Vol. 3(6):339-46, 2006.

STAM, N.C.; NITHIANANTHARAJAH, J.; HOWARD, M.L.; ATKIN, J.D.; CHEEMA, S.S.; HANNAN, A.J. Sex-specific behavioural effects of environmental enrichment in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *European Journal of Neuroscience*. Vol. 28(4):717-23, 2008.

STONE, B.S.; ZHANG, J.; MACK, D.W.; MORI, S.; MARTIN, L.; NORTHINGTON, F.J. Delayed neural network degeneration after neonatal hypoxia-ischemia. *American Neurologic Association*, Vol. 64:535-546, 2008.

SULLIVAN, P.B. Malnutrition in hospitalized children. *Archives of diseases in childhood* , Vol. 95: 489-490, 2010.

TECKLIN, J.S. Fisioterapia Pediátrica. Editora Artmed, 2002

UMPHRED, DA. Reabilitação Neurológica. Editora Manole LTDA, 4Edição, 2004.

VANNUCCI, R.C. & VANNUCCI, S.J. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Developmental Neuroscience*. Vol.27: 81-86, 2005.

VAN DEN TWEEL, E.R.; KAVELAARS, A.; LOMBARDI, M.S.; NIJBOER, C.H.; GROENENDAAL, F.; VAN BEL, F.; HEIJNEN, C.J. Bilateral molecular changes in a neonatal rat model of unilateral hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatric Research*. Vol 59(3):434-439, 2006.

WANG, J.L.; STONER, G.D.; BRAY, T.M. Dietary supplementation with cysteine prodrugs selectively restores tissue glutathione levels and redox status in protein-malnourished rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol.13: 625-633, 2002.

WHISHAW, I.Q.; LI, K.; WHISHAW, P.A.; Grony, B.; METZ, G.A. Distinct forelimb and hind limb stepping impairments in unilateral dopamine-depleted rats: use of the rotorod as a method for the qualitative analysis of skilled walking. *Neuroscience Methods*, Vol 126: 13-23, 2003.

YAGER, JERONE Y. Animal Models of Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Newborn. *Seminars in Pediatric Neurology*, Vol 11: 31-46, 2004.

ZAGRON, G.; WEINSTOCK, M. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behavioural Brain Research*. Vol. 175: 323-328, 2006.