

MICROCEFALIA EXPERIMENTAL: AVALIAÇÃO DE PESO CORPORAL, ENCEFÁLICO E DOS MÚSCULOS SÓLEO E EXTENSOR LONGO DOS DEDOS EM RATOS WISTAR JOVENS

Bárbara Juacy Rodrigues Costa de Santana¹; Daniele Elisa Lopes Machado²; Henrique José Cavalcanti Bezerra Gouveia³; Sabrina da Conceição Pereira⁴; Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciência do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil, barbara.jrcs@gmail.com. ²Pós-Graduação em Nutrição Clínica-IMIP, Recife-PE, Brasil, danieleelisa88@gmail.com. ³Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil; ft.sabrinapereira@gmail.com. ⁴Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco Recife-PE; henriquegouveia.93@hotmail.com. ⁵Departamento de Enfermagem do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão-PE, Recife, aetoscano@hotmail.com.

Resumo: A microcefalia (M) é um distúrbio neurológico onde crianças nascem com o perímetro cefálico menor para idade. O aumento de crianças nascidas com M demonstrou a necessidade de se estudar experimentalmente a M para melhor compreensão de suas sequelas. Neste estudo avaliamos o peso corporal de ratos durante o período de lactação, o peso do encéfalo e dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (ELD) aos 28 dias de vida pós-natais (DPN). Com isso utilizou-se 20 ratas para acasalamento, após confirmação pela técnica de esfregaço vaginal, dividiu-se as ratas em controle (10) e M (10). O grupo M recebeu busulfan (sigma, 10 mg / kg), suspenso em óleo de oliva e o grupo controle recebeu apenas óleo de oliva por via intraperitoneal (i.p.) (0,5 ml / 100 g de PC das ratas) nos dias 12-14 de gestação. Após o nascimento dos filhotes, avaliou-se o peso corporal (PC) nos 21 DPN e aos 28 DPN realizou-se a eutanásia para obter tecidos (sóleo, EDL, e encéfalo). O PC e muscular não se mostraram estatisticamente diferentes, nem todas crianças apresentam diminuição de PC. O peso encefálico está estatisticamente menor, sendo uma das características da M. O peso muscular relativo (PMR) também demonstrou diferença, os animais apresentam hemiparesia direita, distúrbio também encontrado em outros distúrbios neurológicos quando acomete a migração celular. Nós concluímos que a administração da droga induziu a diminuição do encéfalo sendo adotada a classificação de microcefalia, e também demonstrou hemiparesia direita após análise do PMR, porém, não alterou o peso corporal nem muscular.

Palavras-chave: Microcefalia, Microcefalia experimental, Busulfan e Hemiparesia direita.

Introdução

No Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil houve um rápido aumento no número de casos suspeitos de microcefalia em recém-nascidos vivos a partir de agosto de 2015 (SENE, 2015). A possível associação entre o aumento do número de casos de microcefalia e surtos de infecção pelo vírus Zika no Brasil desde o final de 2014, especialmente no Nordeste, tornou-se o objeto de intensa investigação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Em uma definição operacional da presença de microcefalia, considera-se o recém-nascido a termo com um perímetro cefálico de 31,9 cm ou menos para meninos e 31,5 meninas, que foi reduzido em 9 março de 2015, segundo o Ministério de Saúde que

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

adotou a recomendação da OMS. Até 2014, menos de 15 recém-nascidos com microcefalia foi informado mensalmente no Brasil, um número que aumentou muito em 2015. No Brasil, entre meados de 2015 e 8 de outubro de 2016, 9.814 casos suspeitos de microcefalia foram relatados (MARINHO et al. 2016). Autores referem que o mecanismo para as deformidades na infecção pelo vírus Zika não são totalmente claras, mas provavelmente resultam do neurotropismo do vírus com danos subsequentes no cérebro e interferência na sinalização neuromuscular levando a acinesia fetal (MARTINES et al. 2016). Em cérebro de camundongos neonatos e fetais foi observado que a infecção pelo Zika vírus causa redução do número de neurônios corticais e da espessura de camada cortical (MINER et al. 2016). A análise celular mostrou que os neurônios no córtex cerebral, tálamo e hipotálamo estavam deteriorados (MINER et al. 2016).

Os períodos vulneráveis durante o desenvolvimento do sistema nervoso central são sensíveis às agressões ambientais, eles são dependentes do aparecimento temporal e espacial de processos críticos, tais como: a proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização, e apoptose (RICE e BARONE, 2000). Estes processos são altamente sensíveis as variações ambientais, físicas, químicas e biológicas (RICE e BARONE, 2000). Os distúrbios da migração neuronal em decorrência dessas variações são as principais causas de microcefalia nos mamíferos (FURUKAWA, et al., 2007). Devido a semelhança nos mecanismos envolvidos, vem se utilizando com frequência, modelos de microcefalia experimental (FURUKAWA, et al., 2007). A microcefalia replicada experimentalmente é a consequência das evidências de que insultos físicos e agentes químicos empregados em gestantes produzem a doença; nesse particular, destaca-se o caso do Busulfan, um agente de alquilação, usado como anti-neoplásico no tratamento de leucemia mielóide crônica durante a gravidez (BISHOP E WASSON, 1986). É um agente teratogênico indutor de microcefalia em um grande percentual dos casos (NAGAI, 1972; KASUGA e TAKAHASHI, 1986).

O fenótipo de um indivíduo é a expressão última da interação do seu genótipo (conjunto de genes) e do ambiente (WEST-EBERHARD, 1986). Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que variações ambientais na vida precoce podem levar às mudanças fenotípicas com repercussões permanentes no metabolismo, estrutura e função dos sistemas fisiológicos (TOSCANO et al., 2008).

Um dos sistemas mais sensíveis às variações ambientais é o sistema nervoso central (MORGANE *et al.*, 1993). Distúrbios neurológicos

podem ser resultantes de uma agressão ambiental ocorrida durante o desenvolvimento cerebral do feto (BAX et al., 2005). São os casos da Paralisia Cerebral e da Microcefalia, que por vezes se acompanham, e que são considerados transtornos neurológicos (YEARGIN-ALLSOPP et al., 2008).

O sistema muscular é bastante plástico. Estudos mostram que agressões ambientais como a desnutrição durante os períodos críticos do desenvolvimento modificam o fenótipo muscular e as propriedades biomecânicas do músculo a curto e a longo prazo (TOSCANO et al., 2008; TOSCANO et al., 2010; ARAGÃO et al., 2014; FERRAZ-PEREIRA et al., 2015). Tanto a paralisia cerebral quanto a microcefalia, são consideradas graves problemas de saúde que afetam milhares de recém-nascidos e crianças, sobretudo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (HIMMELMANN, 2013). Em virtude disso têm sido investigados em estudos experimentais, os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de sequelas físicas observados em distúrbios neurológicos (STRATA et al., 2004). Neste contexto, existem alguns modelos experimentais da paralisia cerebral e microcefalia em ratos, que tentam reproduzir os danos causados por esses distúrbios e isso permite, dentro dos devidos limites, a extrapolação para humanos (JOHNSTON et al., 2006). Tais modelos vêm contribuindo na construção de potenciais terapias que visam minimizar a incapacidade crônica de transtornos neurológicos (OLIVEIRA, 2009). Contudo, há uma escassez de relatos na literatura científica, evidenciando a utilização destes modelos experimentais sobre o fenótipo muscular, considerado um dos elementos chaves na avaliação da integridade do sistema neuro-músculo-esquelético.

A exposição materna ao busulfan presta-se como um modelo experimental de microcefalia, pois reproduz, em ratos jovens, as alterações presentes nos filhos de mulheres infectadas por Zika vírus durante a gestação. Desta forma, pretende-se avaliar o peso corporal de ratos durante o período de lactação, o peso do encéfalo e dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL).

Metodologia

Serão utilizadas 20 ninhadas oriundas de 20 gestantes da linhagem *Wistar*, provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória, mantidos a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas e livre acesso à água e alimentação. Após a confirmação da gestação,

através da técnica de esfregaço vaginal, serão formados aleatoriamente dois grupos de gestantes, com base na indução farmacológica de microcefalia: Controle (C, n=10) e Microcefalia (M, n=10). O grupo microcefalia receberá busulfan (sigma, 10 mg / kg), suspenso em óleo de oliva e o grupo controle receberá apenas óleo de oliva, administrados por via intraperitoneal (i.p.) (0,5 ml / 100 g de peso corporal das ratas). As ratas serão tratadas diariamente durante 12-14 dias, fase inicial de desenvolvimento do córtex cerebral (DESESSO, 2005). A dose de 10 mg /g i.p. foi previamente relatada como sendo efetiva para induzir microcefalia por Furukawa et al. 2007, em estudo dose/resposta. Após o nascimento, os filhotes serão mantidos com suas respectivas mães, até os 21 dias de vida pós natal (P22). Nesse dia, os animais serão desmamados e separados em gaiolas individuais (3-4 animais por gaiola). A partir daí, serão alimentados apenas com dieta padrão do biotério até os 28 dias de vida pós-natal, quando serão decaptados para coleta dos músculos esqueléticos. O presente estudo foi submetido ao comitê de ética em experimentação animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (número do protocolo CEUA 0040/2016).

Peso corporal

Os filhotes foram analisados diariamente durante os 21 dias de vida pós-natais às 8 horas da manhã.

Coleta de músculo e encéfalo

Aos 28 dias de vida pós-natais os animais foram eutanasiados por decaptação para coletas dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) e foram normalizados e coleta do encéfalo. Após sua coleta foram pesados.

Análise Estatística

Os dados foram analisados e feitos os gráficos através do software Prisma[®] 7.0. Para normalização foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov. Teste Kruskal-Wallis foi utilizado para peso corporal. No peso encefálico e peso muscular utilizamos Mann Whitney. Peso muscular relativo Teste t. Para Significação estatística utilizada foi $p < 0.05$ em todos os casos.

Resultados e Discussão

Os pesos corporais dos animais experimentais não se mostraram diferentes em relação ao grupo controle (figura 1).

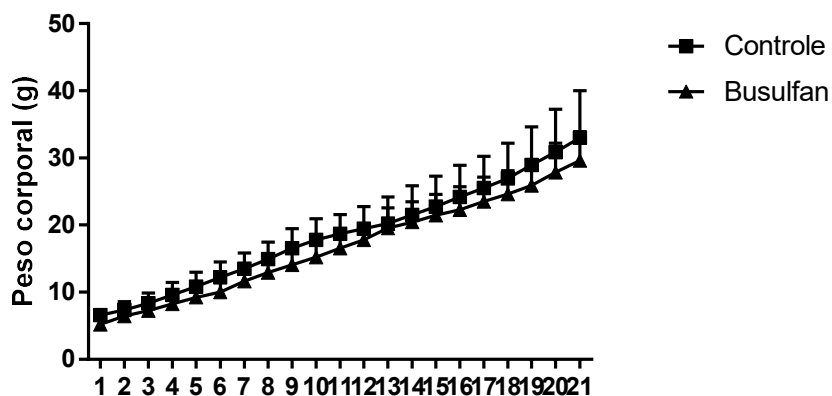


Figura 1. (A) Peso corporal durante o período de lactação (n=21) controle, (n=33) busulfan; os dados são expressos em média \pm desvio-padrão. Para o teste de comparação entre os grupos foi utilizado de teste Kolmogorov-Smirnov seguido de Kruskal-Wallis.

Esses resultados sugerem que o peso corporal do animal não se mostrou estatisticamente inferior ao grupo controle durante os 21 dias de vida, o fato já se esperava tendo em vista que o artigo de Furukawa (2007) avaliou o peso dos seus animais em vários momentos da gestação quando o mesmo interrompia a prenhez, e observou que a medida que as idades aumentavam os animais deixavam de obter uma diferença estatística do grupo controle, passando a ter o peso corporal parecido. Também se observa que crianças nascidas com microcefalia não necessitam ser baixo peso ao nascer para assim receber a classificação e diagnóstico (MARINHO et.al. 2016 e VARGAS et.al. 2016), porém o mais comum e encontrado em maior quantidade é a criança ser desnutrida, como é observado no artigo de Marinho (2016).

O Peso do encéfalo aos 28 dias de vida após a eutanásia por decaptação revelou-se menor ($p < 0,05$) quando comparado o grupo controle com o experimental (figura 2).

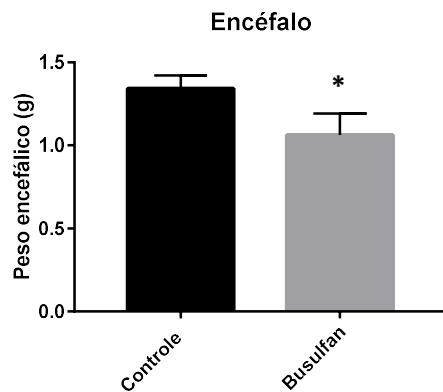
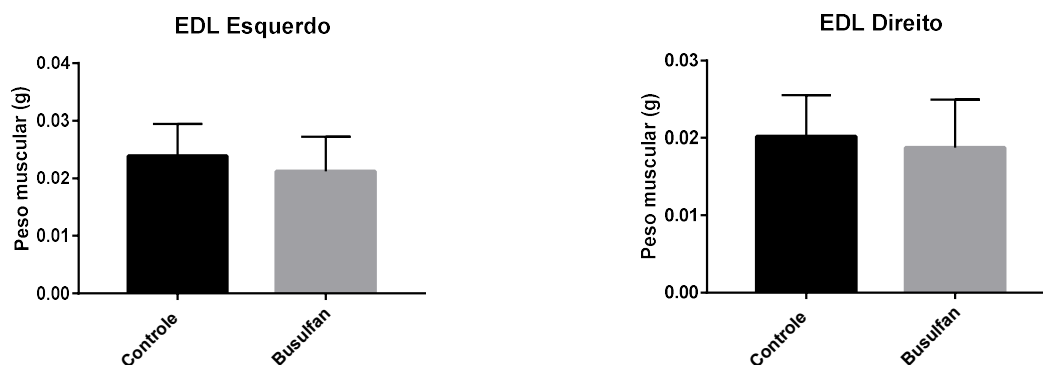


Figura 2. Peso encefálico do grupo controle (n=6), e com microcefalia (n=10) foram expressos em média \pm desvio-padrão * $p < 0,05$. Para o teste de comparação entre os grupos foi utilizado de teste Kolmogorov-Smirnov seguido de Mann Whitney.

O peso encefálico aos 28 dias de vida do animal demonstrou-se menor, subentendendo que existe uma restrição de crescimento encefálico dos filhotes, característica imprescindível na microcefalia, fato também comprovado por Furukawa (2007), onde o mesmo verifica que o peso encefálico do filhote controle é maior em comparação ao grupo experimental.

O Peso dos músculos extensor longo dos dedos (EDL) e os músculos sóleo não apresentaram diferença estatisticamente ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (figura 3).



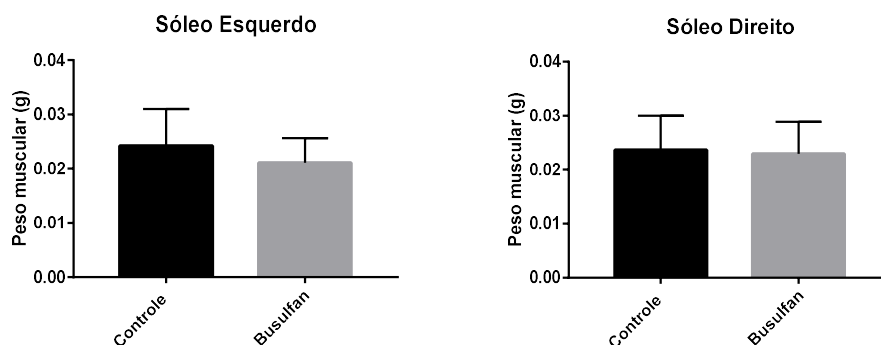
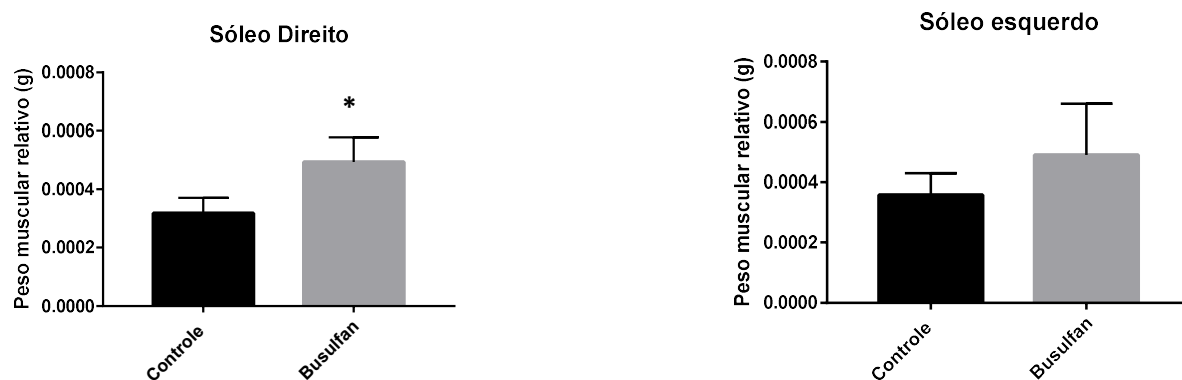


Figura 3. Peso encefálico do grupo controle (n=10), e com microcefalia (n=12) foram expressos em média \pm desvio-padrão. Para o teste de comparação entre os grupos foi utilizado de teste Kolmogorov-Smirnov seguido de Mann Whitney.

Os resultados do peso de músculo não se mostraram estatisticamente diferentes entre o grupo controle e o experimental, porém já se sabe que nem todas as crianças com microcefalia apresentam alterações motoras, assim entendesse que nem todas as crianças portadoras de microcefalia precisam apresentar alterações motoras (CRUZ, 2016).

Peso muscular relativo de sóleo direito e EDL direito se mostraram estatisticamente menor ($p < 0,05$) em comparação aos músculos sóleo esquerdo e EDL esquerdo (figura 4).



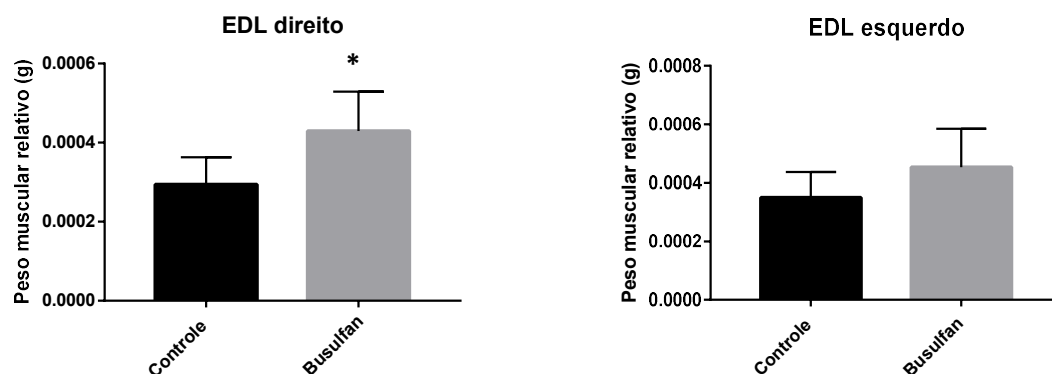


Figura 4. Peso encefálico do grupo controle (n=4), e com microcefalia (n=11) foram expressos em média \pm desvio-padrão * $p < 0,05$. Para o teste de comparação entre os grupos foi utilizado de teste Kolmogorov-Smirnov seguido de Peso muscular relativo Teste t.

O peso muscular relativo mostrou-se estatisticamente maior para o lado direito dos animais do grupo busulfan, demonstrando que existe uma hemiparesia direita. Distúrbio esse, que acomete indivíduos com distúrbios neurológicos, como visto no artigo de Marilíis (1993) que algumas pessoas com paralisia cerebral tendem a desenvolver hemiparesia direita, ocorrida por distúrbio de migração neural no período de pré-natal.

Conclusão

Diante disto, ressaltamos que o modelo experimental de microcefalia induzida por busulfan é capaz de apresentar as consequências encontradas em humanos nos filhotes submetidos a esta indução.

Referências

- ARAGÃO, R.S. *et al.* **Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition.** Acta Physiol(Oxf),v.210,n.1,p;70-83.Jan 2014.
- BAX, M. *et al.* **Proposed definition and classification of cerebral palsy.** Developmental medicine and child neurology, v.47,n.8,p.571-6, Apr 2005.
- BRASIL. **Protocolo de atenção à saúde e resposta à ocorrência de microcefalia**

relacionada à infecção pelo vírus zika. Secretaria da saúde, Brasília-DF, versão 1, 2015.

BISHOP, J.B; WASSOM, J.S. **Toxicological review of busulfan (Myleran)**. Mutation research, v.168, n.1, p.15-45, 1986.

CRUZ, R.S.B.L.C. *et al* . **Protocolos de atenção pré-natal à gestante com infecção por Zika e crianças com microcefalia: justificativa de abordagem nutricional**. Rev. Bras. Saúde Mater. Infant., Recife , v. 16, supl. 1, p. S95-S102, Nov. 2016.

DESESSO, J. M. **Comparative features of vertebrate embryology**. In: **Developmental and reproductive toxicology**. A practical approach. 2nd ed. Hood R.D. (ed). Taylor & Francis, p. 147-197, 2005.

FERRAZ-PEREIRA, K.N. *et al*. **Neonatal low-protein diet reduces the masticatory efficiency in rats**. Br J Nutr, v.114, n.9, p.1515-30.2015.

FURUKAWA, S. *et al*. **Microencephaly and microphthalmia in rat fetuses by busulfan**. Histol Histopathol, v.22, n.4, p.389-397. Apr, 2007.

HIMMELMANN, K. **Pediatric Neurology Part I: Chapter 15**. Epidemiology of cerebral palsy. Elsevier Inc. Chapters; 2013.

JOHNSTON, M.V.; HOON, J.R. A.H. **Cerebral palsy**. Neuromolecular Med. v.8, n.4, p.435-50. 2006.

KASUGA, F.; TAKAHASHI, M. **The endocrine function of rat gonads with reduced number of germ cells following busulphan treatment**. Endocrinologia japônica, v.33, n.1, p.105-15, 1986.

MARILÍIS, A.M. *et al*. **HEMIPARESIA CONGÊNIT A AVALIAÇÃO NEUROPSICOLÓGIC A COMPLEMENTA R UTILIZANDO COMPUTADOR**. ARQ. Neuropsiquiat, v.51, n.4, p502-506. 1993.

MARINHO, F. *et al* . **Microcefalia no Brasil: prevalência e caracterização dos casos a partir do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc), 2000-2015**. Epidemiol. Serv. Saúde, Brasília , v. 25, n. 4, p. 701-712, Dec. 2016.

MARTINES, R. B. *et al*. **Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally**

Infected Newborns and Two Fetal Losses – Brazil, 2015. MMWR: Morb Mortal Wkly, v. 65, n. 6, p. 1-2, 2016.

MINER, J.J.; CAO, B.; GOVERO J. *et al.* **Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise.** Cell, v.165,p.1081-91,2016.

MIRANDA-FILHO, D. B. *et al.* **Initial description of the presumed congenital zika syndrome.** Am J Public Health., v. 106, n. 4, p. 598- 600, Apr. 2016.

MORGANE, P. J. *et al.* **Prenatal malnutrition and development of the brain.** Neurosc, Biobeh. v.17, p.91-128, 1993.

NAGAI H. **Effects of transplacentally injected alkylating agents upon development of embryos. Appearance of intrauterine death and mesodermal malformation.** The Bulletin of Tokyo Dental College,v.13,n.2,p103-19,1997.

OLIVEIRA, A.I.A.; PAIXÃO, G.M.C., MARCOS,V.C. **Brinquedos adaptados para crianças com paralisia cerebral.** Revista do Nufen, ano 1, v.1, p. 171-186, 2009.

RICE,D.; BARONE,S.JR. **Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models.** Environ Health Perspect,v.108,n. 3,p.511–533, Jun 2000.

SENE, A. **Ministério da Saúde investiga aumento de casos de microcefalia em Pernambuco.** Caderno Vida Urbana. Diário de Pernambuco 2015 (acessado em 23/06/2016).

STRATA. J. *et al.* **Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization - implications for a rodent model of cerebral palsy.** Neuroscience, v.129,n.1,p.141-56, 2004.

TOSCANO A.E.; MANHÃES-DE-CASTRO R.; CANON F. **Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats.** Nutrition, v.24,n.3,p.270-8, Mar 2008.

TOSCANO, A.E. *et al.* **Passive stiffness of rat skeletal muscle undernourished during fetal development.** Clinics (Sao Paulo),v.65,n.12,p.1363-9.2010.

VARGAS, A. *et al.* **Características dos primeiros casos de microcefalia possivelmente relacionados ao vírus Zika notificados na Região Metropolitana de Recife, Pernambuco**
1 Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em

Saúde, Brasília-DF, Brasil 2 Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco, Recife-PE, Brasil, Brasília, v.25,n.4,p.691-700, out-dez 2016.

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

YEARGIN-ALLSOPP,M. *et al.* Prevalence of cerebral palsy in 8-year-old children in three areas of the United States in 2002: a multisite collaboration. Pediatrics,v.121,n.3,p.547-54.Mar 2008.