

Título do Projeto:

Avaliação da estimulação precoce através do ambiente enriquecido em lesão encefálica do tipo hipóxia-isquemia: modelo experimental

Orientadora: Lenir Orlandi Pereira Silva

Período Integral das atividades: 01/08/2013 a 31/07/2014

Resumo: Apesar de inúmeros trabalhos avaliarem os benefícios do enriquecimento ambiental em diferentes modelos animais com lesão cerebral, ainda não há consenso se esta atividade promove um efeito compensatório ou a recuperação real. Logo, os mecanismos do SNC envolvidos nos efeitos benéficos da intervenção precoce após uma lesão cerebral neonatal ainda são pouco compreendidos. Além disso, os estudos sobre os efeitos do enriquecimento ambiental em humanos são escassos, principalmente pela existência de variáveis intervenientes, i.e., aspectos emocionais e interpessoais. Portanto, é importante a realização de pesquisas que avaliem os benefícios do enriquecimento ambiental no desenvolvimento neurocomportamental em roedores. Sendo assim, o objetivo deste estudo é avaliar no modelo experimental as prováveis adaptações neurocomportamentais devido à estimulação precoce através do enriquecimento ambiental.

Atividade 1: Realização do procedimento de hipóxia-isquemia: 01/08/2013 – 01/12/2013

DESCRIÇÃO: A Hipóxia-Isquemia (HI) neonatal é um evento lesivo ao sistema nervoso central, sendo uma importante causa de sequelas neurológicas, como paralisia cerebral, epilepsia, entre outras. O modelo de hipóxia-isquemia neonatal foi proposto por Rice e colaboradores (1981) e consiste na indução de dano encefálico por meio da oclusão da artéria carótida direita em ratos com 7 dias pós-natal, seguido de exposição à ambiente hipóxico. A partir desse método, ocorrem lesões do lado ipsilateral ao da oclusão, o que irá reproduzir os achados neuropatológicos em humanos, nas áreas do estriado, córtex, e hipocampo (PEREIRA *et al.*, 2006). Este procedimento é realizado a partir da disponibilidade de levas de ratas prenhas pelo CREAL –UFRGS.

RELATÓRIO DA ATIVIDADE: Tal procedimento envolve, primeiramente, observação por parte da aluna e, posteriormente, treinamento desta a fim de que possa reproduzir o modelo de lesão, sempre mantendo um comportamento ético em relação aos animais para minimizar o sofrimento dos mesmos.

Atividade 2: Realização do enriquecimento ambiental em roedores: 15/08/2013 – 31/01/2014

DESCRIÇÃO: 24 horas após a realização do procedimento de hipóxia-isquemia, os animais do grupo enriquecido foram alojados nas gaiolas moradias devidamente enriquecidas. O ambiente enriquecido consistiu em uma combinação de exercício físico, interação social e exposição contínua a tarefas de aprendizado. Foi utilizada uma gaiola grande (39 x 40 x 20 cm; 80 cm² de área total), com 2 diferentes andares ligados por rampas e disponibilizados brinquedos, rodas para correr e outros objetos

com texturas e tamanhos distintos, com base em estudos previamente descritos (Pereira, Arteni *et al.*, 2007). Uma vez por semana, todos os objetos foram alterados e a gaiola limpa. Cada ninhada experimental foi abrigada em gaiolas enriquecidas, enquanto os filhotes não-estimulados, foram alojados em caixas-padrão de laboratório. Foi adotado um limite de 6-8 animais (de 3 a 4 animais de cada sexo).

RELATÓRIO DA ATIVIDADE: Esta atividade envolve troca dos objetos e limpeza das gaiolas enriquecidas uma vez por semana durante todo o período do enriquecimento ambiental.

Atividade 3: Realização dos testes comportamentais para avaliação de parâmetros do desenvolvimento neurocomportamental em ratos neonatos: 01/08/2013 – 28/02/2014

DESCRIÇÃO: Foram avaliados indicativos de maturação das características físicas: abertura dos olhos, erupção do incisivo e desdobramento das orelhas. Os reflexos da marcha, geotaxia negativa e aversão à queda serão avaliados 24 horas antes da indução da HI, 24 horas após a HI e a cada 3 dias até o 20º dia pós-natal. Sinais e reflexos neurológicos avaliados: (1) Reflexo do endireitamento: avalia a função motora e coordenação, os animais são colocados em decúbito dorsal e mensura-se o tempo para passar para o decúbito ventral. (2) geotaxia negativa: avalia a propriocepção e orientação; os animais são colocados com a cabeça direcionada para baixo em uma superfície inclinada (prancha à 45°), o dia que os animais saem dessa posição e escalam a prancha é anotado assim como a latência para realizar o teste. (3) Reflexos sensoriais: as orelhas e os olhos são gentilmente tocados e o dia que ocorre a contração das orelhas e das pálpebras é anotado. (4) Posicionamento das patas: o dorso das patas anteriores e posteriores são tocadas na borda da mesa enquanto o animal é suspenso pelo avaliador; o primeiro dia do levantamento e posicionamento das patas na mesa é anotado. (5) Preensão: as patas anteriores e posteriores são direcionadas a tocar uma fina haste metálica; o dia que ocorre a preensão é anotado. (6) Marcha: os animais são colocados no centro de um círculo (13 m de diâmetro) e o dia que começam a se locomover para fora do círculo é anotado. (7) Reflexo auditivo: o primeiro dia que o animal responde com um sobressalto ao se bater palmas.

RELATÓRIO DA ATIVIDADE: Os testes comportamentais exigem especial atenção e cuidado por parte do avaliador, visto que alterações no ambiente e na forma de manipulação dos animais podem gerar resultados controversos. A aluna acompanhou todos os testes e é capaz de identificar a aplicabilidade de cada um deles. Nossos resultados até então são mostrados nos gráficos a seguir. Os principais achados mostram que os animais HI enriquecidos tiveram melhor desempenho nos reflexos da marcha e geotaxia negativa no dia pós-natal 11. Já os reflexos de endireitamento e aversão à queda não foram alterados pelo enriquecimento.

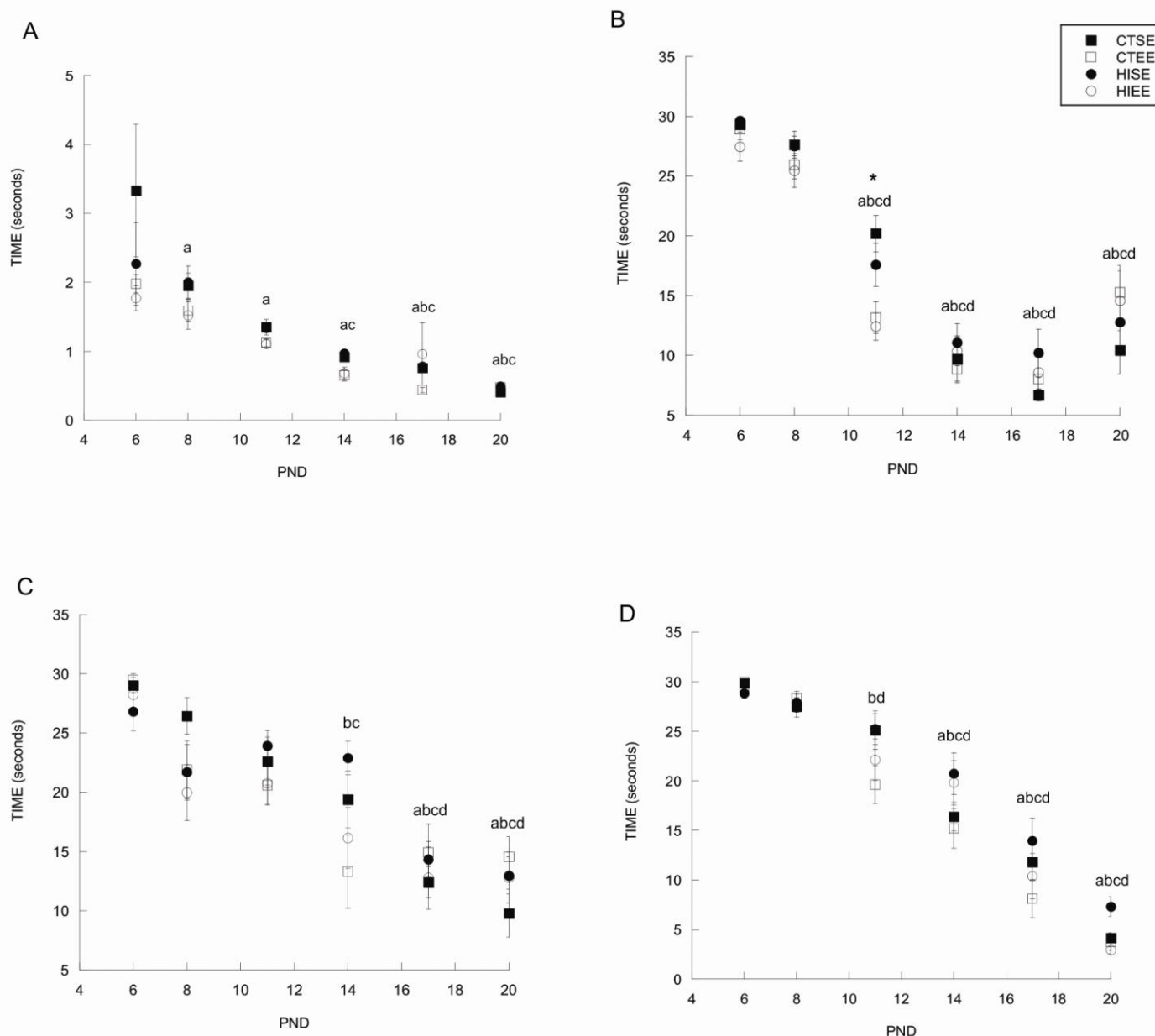


Figure 1. Performance diária do reflexo do endireitamento (A), geotaxia negativa (B), aversão à queda (C) and locomoção (D). * $p < 0.05$ entre grupos; letras diferentes incam diferença significativa entre os dias quando comparado com o dia pós natal 6: (a) CTSE group; (b) CTEE group, (c) HISE group, (d) HIEE group.

Atividade 4: Perfusão dos animais e remoção dos encéfalos: 01/01/2014 – 31/07/2014

DESCRIÇÃO: Perfusão: os animais foram anestesiados, com ketamina e xilazina por via i.p., injetados com heparina no ventrículo esquerdo e perfundidos por via transcardíaca com solução salina seguida de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato 0,1M. Os encéfalos foram removidos e fixados na mesma solução em temperatura ambiente por 4 h, crioprotégidos através da imersão em soluções crescentes de sacarose (15-30%) em tampão fosfato até afundarem. Após, os encéfalos foram crioprotégidos em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para posterior análise.

RELATÓRIO DA ATIVIDADE: A aluna participou da perfusão dos animais e da remoção dos encéfalos.

Atividade 5: Preparação de materias para análise histológica: 01/01/2014 – 31/07/2014

DESCRIÇÃO: A obtenção de amostras de tecido ou preparados histológicos retirados de um organismo é de extrema importância, e por isso é crucial que se saiba cada etapa do processamento de amostras, desde a retirada das estruturas de interesse, preparação de soluções que serão utilizadas para fixação e preservação do material, até a parte de cortes histológicos, coloração de lâminas, análise de imagens, entre outras. Também é de suma importância que as lâminas de vidro que servirão de suporte para os cortes histológicos estejam sempre prontas para uso, ou seja, gelatinizadas para adesão do tecido ao vidro, e que as lamínulas estejam sempre bem limpas, a fim de preservar o corte de qualquer contaminação ou mudança qualquer devido a interação com o ambiente.

RELATÓRIO DA ATIVIDADE: A aluna auxiliou na retirada das estruturas de interesse, fixação e preservação do material para posterior análise, sendo responsável também pela preparação de todas as soluções que foram utilizadas em perfusões e preservação de amostras (paraformaldeído, tampão fosfato, solução salina, soluções de sacarose...). A aluna é capaz de fazer coloração de Hematoxilina-Eosina utilizada neste e em outros projetos. Auxiliou na contagem de células da região do estriado e neocortex através da utilização do software ImageJ. Resultados da contagem apresentados abaixo indicam que o lado ipsilateral e contralateral foram afetados pela hipóxia isquemia sem reversão pelo enriquecimento ambiental.

Table 1. Efeito da lesão na contagem de células

Grupo	Estriado		Neocortex	
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
CTAP	289.44±26.2	274.43±29.2	255.30±29.0	257.10±27.4
CTEA	293.72±27.8	271.17±18.0	247.29±12.1	243.60±20.9
HIAP	155.21±10.2*	111.75±4.3*	161.25±14.0*	113.96±0.5*
HIEA	150.35±9.1*	128.94±7.6*	143.65±8.6*	121.99±7.1*

Nota: Média±EP. *Diferença entre HI e Controle, p<.05.

Atividade 6: Participação nos seminários do grupo. 01/08/2013 - 31/07/2014

DESCRIÇÃO: O aluno de Iniciação Científica deverá, sempre que possível, participar dos seminários realizados no grupo de pesquisa. Nesses encontros, são realizadas discussões de artigos científicos e apresentações de resultados dos membros do grupo. O aluno IC além de participar das discussões, participará eventualmente também como apresentador nos seminários.

RELATÓRIO DA ATIVIDADE: A aluna vem participando, sempre que possível, das atividades complementares (seminários, discussões, etc), onde além de ouvinte, também apresenta seminários com artigos publicados em periódicos.

Outras contribuições do bolsista:

- Participação no trabalho do aluno de Doutorado Ramiro Diaz, auxiliando na separação materna, enriquecimento ambiental, testes comportamentais, decapitação e/ou perfusão dos animais;
- Participação no trabalho da aluna de Doutorado Jaqueline Vieira Carletti, auxiliando no procedimento de hipóxia-isquemia neonatal e testes comportamentais.

A aluna Micheli Ferla é aluna de Iniciação há apenas 9 meses; período no qual me foi concedida a segunda bolsa de IC. Assim, o relatório de atividades ainda é incipiente, visto que deste período incluiu-se um período de familiarização e aprendizado dos procedimentos rotineiros do laboratório. Atualmente, a aluna já tem certa independência em alguns procedimentos, porém a continuação da bolsa é imprescindível para a continuação da formação do processo de Iniciação Científica a graduanda.