

# CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE PARALISIA CEREBRAL EM RATOS: COGNIÇÃO E ESTRUTURA DO HIPOCAMPO E AMÍGDALA

## CHARACTERIZATION OF A MODEL OF CEREBRAL PALSY IN RATS: COGNITION AND STRUCTURE OF THE HIPPOCAMPUS AND AMYGDALA

Bruno Popik<sup>1</sup>, Brenda Camila Reck de Oliveira<sup>2</sup>, Wellington de Almeida<sup>3</sup>, Adriana Souza dos Santos<sup>4</sup>; Márcia Miranda Torrejais<sup>5</sup>; Marcelo Alves de Souza<sup>6</sup>; Lígia Aline Centenaro<sup>7</sup>

### RESUMO

**Fundamento** - A paralisia cerebral (PC) é caracterizada por distúrbios do movimento e da postura, que podem estar associados a déficits cognitivos. Tais comprometimentos são atribuídos a lesões não progressivas ao encéfalo em desenvolvimento. No âmbito experimental, modelos animais dessa condição clínica capazes de reproduzir o fenótipo e as alterações estruturais vistas em humanos são escassos. **Objetivo** - Investigar as repercussões da indução de um modelo de PC sobre a função cognitiva e estrutura do hipocampo e amígdala em ratos *Wistar*. **Métodos** - Dois grupos experimentais foram utilizados: 1) Controle - filhotes de ratas injetadas com solução salina durante a gestação ( $n=8$ ) e 2) Paralisia cerebral - filhotes de ratas injetadas com Lipopolissacarídeo (LPS) durante a gestação ( $n=8$ ), submetidos à anóxia perinatal e restrição sensorio-motora durante 30 dias. A memória espacial dos animais foi avaliada pela tarefa de reconhecimento da localização de objetos, enquanto o comportamento do tipo ansioso foi verificado pelo teste de labirinto em cruz elevado. Após a avaliação comportamental, os animais foram eutanasiados e os encéfalos dissecados para posterior processamento histológico. **Resultados** - O grupo PC apresentou déficits de memória espacial e uma redução do número de neurônios granulares no giro denteado. Entretanto o comportamento do tipo ansioso e a histologia do núcleo central e complexo basolateral da amígdala foram semelhantes entre os grupos. **Conclusão** - Como observado em parte dos pacientes com PC, este modelo experimental prejudica a memória dependente do hipocampo. Entretanto, a combinação de intervenções não alterou a ansiedade e estrutura da amígdala.

**Palavras-chaves:** Anóxia Perinatal, Lipopolissacarídeo, Restrição Sensorio-Motora, Memória Espacial, Ansiedade, Método de Nissl.

### ABSTRACT

**Basis** - Cerebral palsy (CP) is a disorder of movement and posture, which may be associated with cognitive impairments. Such clinical condition is caused by non progressive injuries occurred during the brain development. In the experimental context, animal models of this condition that can reproduce the phenotype and the structural changes seen in humans are scarce. **Objective** - The present study investigated cognitive function and hippocampus and amygdala structure in rats submitted to a CP model. **Methods** - Two experimental groups were used: 1) Control - offspring of rats injected with saline during pregnancy ( $n = 8$ ) and 2) Cerebral Palsy - offspring of rats injected with lipopolysaccharide (LPS) during pregnancy ( $n = 8$ ), submitted to perinatal anoxia and sensorimotor restriction for 30 days. The spatial memory was evaluated by the object-placement recognition task and anxiety like-behavior by elevated plus maze test. After the behavioral assessment, animals were euthanized and brains dissected for histological processing. **Results** - The PC group showed spatial memory deficits and a reduction of granule neurons in the dentate gyrus. However, the anxiety like-behavior and the number of neurons in central nucleus and basolateral complex of the amygdala were similar between studied groups. **Conclusion** - This animal model affects the hippocampus dependent memory, a deficit seen in part of CP patients. However, the interventions used did not alter the anxiety like-behavior and amygdala structure.

**Keywords:** Perinatal Anoxia, Lipopolysaccharide, Sensorimotor Restriction, Spatial memory, Anxiety, Nissl Method.

<sup>1</sup>Biólogo, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR, Brasil

<sup>2</sup>Graduanda de Medicina, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR, Brasil

<sup>3</sup>Graduando de Ciências Biológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR, Brasil

<sup>4</sup>Graduanda de Enfermagem, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR, Brasil

<sup>5</sup>Professora Adjunta, Doutora em Ciências Biológicas: Anatomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR, Brasil

<sup>6</sup>Professor Adjunto, Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, Toledo - PR, Brasil

<sup>7</sup>Professora Adjunta, Doutora em Ciências Biológicas: Neurociências, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - PR, Brasil

**Endereço para correspondência:** Lígia Aline Centenaro - Doutora em Neurociências, Laboratório Experimental de Morfologia, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária 1619, CEP: 85819-110, Cascavel, PR, Brasil, Tel.: 45 32207409 e-mail: lacentenaro@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

A paralisia cerebral (PC), atualmente conhecida como encefalopatia crônica não progressiva da infância, pode ser conceituada como um grupo de distúrbios permanentes do movimento e da postura, atribuídos a lesões que ocorrem durante o desenvolvimento do encéfalo e persistem até a idade adulta<sup>1</sup>. Distúrbios cognitivos, de comunicação e de percepção também podem estar presentes em pacientes com PC<sup>1</sup>. A incidência dessa condição clínica está relacionada a múltiplos fatores etiológicos, incluindo infecções intrauterinas, nascimento prematuro e asfixia ao nascimento<sup>2</sup>. Consequentemente essa patologia apresenta uma elevada prevalência, acometendo 2 a 3 crianças para cada 1000 nascimentos em países desenvolvidos<sup>3</sup>.

Tendo em vista a ampla gama de sinais e sintomas associados a PC, existe a necessidade do desenvolvimento de um modelo animal que reproduza o fenótipo observado nessa doença. Stigger e colaboradores<sup>4</sup> (2011) desenvolveram um modelo de PC em roedores baseado na exposição pré-natal ao lipopolissacarídeo (LPS), associada a uma anóxia perinatal e restrição sensorio-motora. A administração de LPS aumenta a vulnerabilidade do encéfalo a lesões, uma vez que causa uma infecção materna subclínica durante a gestação<sup>4</sup>. A anóxia perinatal em roedores pode causar entre outros déficits cognitivos, prejuízos na memória espacial devido a danos hipocampais<sup>5</sup>. A restrição sensorio-motora durante os primeiros estágios de desenvolvimento altera a função motora, causando atrofia das fibras musculares e aumento do tônus muscular<sup>6</sup>. Assim, a combinação dessas três agressões pode reproduzir parte dos déficits observados em crianças com PC.

Estudos prévios mostram que pacientes com essa patologia podem apresentar problemas no aprendizado e, consequentemente, o rendimento escolar e o desenvolvimento de suas capacidades intelectuais ficam limitados<sup>7</sup>. O hipocampo é uma região encefálica associada ao aprendizado e a memória. Em roedores, sabe-se que o hipocampo é responsável pelo processamento da memória espacial e de reconhecimento de objetos<sup>8</sup>. Outra estrutura encefálica associada com memórias e emoções é a amígdala, que é composta de grupos heterogêneos de núcleos e subnúcleos<sup>9</sup>. O complexo basolateral (BLA) e o núcleo central da amígdala (CeA), são as principais regiões da amígdala relacionadas com o comportamento do tipo ansioso<sup>9</sup>.

Uma vez que parte dos pacientes com PC apresentam alterações cognitivas em associação aos compro-

metimentos motores, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar possíveis alterações na memória espacial e no comportamento do tipo ansioso de filhotes de ratos submetidos a um modelo experimental de PC. Além disso, a morfologia do hipocampo e do CeA e BLA da amígdala desses animais foi investigada na busca de achados neuropatológicos associados a possíveis déficits cognitivos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Animais e indução da PC*

Este estudo seguiu os princípios éticos recomendados pela lei AROUCA (nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), bem como as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Além disso, o presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

Ratos *Wistar* adultos (42 fêmeas e 10 machos), com aproximadamente três meses de idade, procedentes do Biotério Central da UNIOESTE foram utilizados. Durante o protocolo experimental os animais foram condicionados em caixas de policarbonato (27 x 26 x 31 cm), receberam água e comida *ad libitum* e foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada (20°C ±2) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Após o acasalamento, parte das prenhas foram injetadas intraperitonealmente com veículo ( $n=15$ ; 100 µL de solução salina estéril), enquanto as demais receberam injeções intraperitoneais de LPS ( $n=27$ ; 200 µL/kg de LPS em 100 µL de solução salina estéril). As injeções de solução salina e de LPS foram realizadas a cada 12 horas (07:30 e 19:30 h), desde o 17º dia gestacional (G17) até o final da gestação (G21).

No dia do nascimento (P0), os filhotes cujas mães foram injetadas com LPS foram submetidos a uma anóxia. Para isso, os mesmos foram colocados em uma câmara fechada com um fluxo de 9L/minuto de nitrogênio (100%) durante 20 minutos. Esse aparato permaneceu parcialmente imerso em água mantida a 37 °C ±1, visando a conservação da temperatura corporal dos animais.<sup>4</sup> Os filhotes do grupo controle foram submetidos apenas a uma simulação do procedimento de anóxia no P0.

Apenas os filhotes machos foram utilizados nesse experimento, os quais formaram os seguintes grupos experimentais: 1) Grupo controle - filhotes de ratas injetadas com solução salina durante a gestação (CT,  $n=8$ ) e 2) Grupo PC - filhotes de ratas injetadas com LPS durante a gestação, submetidos à anóxia perinatal e restrição sensó-

rio-motora durante 30 dias (PC,  $n=8$ ).

A partir do primeiro dia pós-natal até o trigésimo, os filhotes do grupo PC tiveram seus membros posteriores imobilizados 16 horas por dia. Essa restrição sensorio-motora foi mantida através do uso de fita microporosa adesiva e moldes de epóxi ajustados ao tamanho de cada animal. Da mesma forma, os animais do grupo controle receberam manipulação semelhante aos submetidos à restrição sensorio-motora, mas não ficaram imobilizados.

### *Tarefa de reconhecimento da localização de objetos*

A memória espacial dos animais foi avaliada 47 dias após o nascimento através da tarefa de reconhecimento da localização de objetos, descrita previamente por Piazza e colaboradores<sup>10</sup>. O aparato de teste consiste em uma caixa confeccionada em madeira com uma parede de vidro (60 x 60 x 60 cm). Uma habituação ao contexto foi realizada um dia antes do teste, na qual os animais foram colocados nessa caixa com dois objetos diferentes em seu interior durante 5 minutos. No dia seguinte os animais foram novamente colocados no aparato, contendo dois objetos idênticos (garrafas plásticas), posicionados um ao lado do outro no centro da caixa. Após 5 minutos, os animais retornaram a sua caixa moradia e os objetos foram limpos com álcool 70%. Passados mais 50 minutos, o objeto que estava anteriormente colocado no centro da caixa e do lado esquerdo foi reposicionado a noroeste. Depois disso, os animais foram novamente colocados no aparato por mais 5 minutos. Esse último teste foi filmado para a posterior análise do tempo gasto pelo animal na exploração dos objetos, considerada quando o mesmo cheirou ou tocou o objeto com as patas dianteiras, com o nariz ou com as vibrissas. A preferência para exploração do objeto relocado foi calculada a partir da razão tempo de exploração do objeto relocado / tempo total de exploração de ambos os objetos.

### *Labirinto em cruz elevado*

O labirinto em cruz elevado é um teste comumente utilizado para investigar comportamentos do tipo ansioso, onde os roedores escolhem entre a exploração de um ambiente novo e o medo de áreas abertas<sup>11</sup>. O aparato para esse teste consiste em dois braços abertos e opostos, além de dois braços fechados por paredes e opostos. Os quatro braços dispõem-se de maneira a formar uma cruz. Apenas os braços abertos permitem que o animal tenha contato com

o ambiente externo e noção de altura. Passados 45 dias do nascimento os animais foram colocados individualmente na área central do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Cada teste teve duração de cinco minutos e foi filmado para a avaliação do tempo gasto pelos animais no braços abertos e fechados, bem como o número de entradas em ambos os braços. Acredita-se que, quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos<sup>11</sup>.

### *Histologia*

Passados 48 ou 49 dias após o nascimento, os animais foram pesados e eutanasiados com uma overdose de cloridrato de quetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg). Em seguida, os mesmos foram perfundidos intracardiacamente com solução salina (0,9%) e paraformaldeído 4% tamponado. Os encéfalos foram dissecados, pós-fixados por 4 horas no mesmo fixador e crioprotetidos em sacarose (15 e 30%) a 4°C. Posteriormente, essas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. Com a ajuda de um atlas histológico<sup>12</sup>, o hipocampo e a amígdala foram seccionados coronalmente a 20 µm de espessura em um criostato. Todos os cortes foram corados utilizando-se o método de Nissl.<sup>13</sup>

Imagens dos cortes do hipocampo com magnificação de 200 vezes foram obtidas através da utilização de um microscópio acoplado a uma câmera digital. Neurônios do giro denteado foram contados em duas imagens (do hemisfério direito de cada animal), dentro de uma área de interesse (10.000 µm<sup>2</sup>), utilizando-se o software *Image Pró-Plus*<sup>®13</sup>. Da mesma forma, imagens dos cortes da amígdala com magnificação de 100 vezes, neurônios e células da glia no CeA e no BLA, em duas áreas de interesse (100.000 µm<sup>2</sup>)<sup>14</sup>. Os neurônios foram identificados pela presença do citoplasma corado com cresil violeta, tamanho mais amplo e borda não esférica. As células da glia foram observadas pela ausência de coloração no citoplasma e aspecto celular esférico<sup>15</sup>. Após a contagem, a razão número de células gliais / número de neurônios observados foi calculada.

### *Análise estatística*

Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. Após a realização de testes de normalidade, os dados foram avaliados através do teste *t de Student* ou pelo teste estatístico não paramétrico de *Mann-Whitney*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. A

análise estatística foi realizada com o auxílio do software *Graph Pad Prism®*.

## RESULTADOS

### Avaliação da memória espacial

O grupo PC apresentou uma redução na preferência pela investigação do objeto realocado em comparação ao grupo CT ( $t = 2.7$ ;  $gl = 18$ ;  $p = 0,0083$ ) (Figura 1A). Além disso, os animais do grupo PC passaram menos tempo explorando ambos os objetos ( $t = 3.0$ ;  $gl = 18$ ;  $p = 0,0037$ ; Figura 1B). Essa redução no tempo de exploração não está relacionada a uma limitação motora, uma vez que não houve diferenças significativas no tempo total de locomoção do grupo PC em comparação ao CT. Entretanto, os dados referentes à locomoção do grupo CT não se mostram homogêneos ( $p = 0,06$ ; Figura 1C).

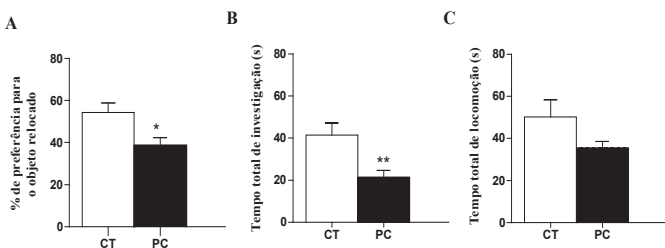


Figura 1. Efeitos da indução do modelo de paralisia cerebral sobre a memória espacial de ratos, avaliada por meio da tarefa de reconhecimento da localização de objetos aos 47 dias de idade. CT – Grupo Controle; PC – Grupo submetido a injeções de LPS, anóxia e restrição sensório-motora. \*Representa  $p < 0,05$  quando comparado ao CT; \*\*Representa  $p < 0,005$  quando comparado ao CT. A – Porcentagem de preferência para o objeto realocado dos animais controle e submetido ao modelo de PC. Teste t de Student para amostras independentes. B – Tempo total de investigação dos animais controle e submetido ao modelo de PC. Teste t de Student para amostras independentes. C – Tempo total de locomoção dos animais controle e submetido ao modelo de PC. Teste de Mann-Whitney. Dados representam à média  $\pm$  erro padrão da média.

### Análise do comportamento do tipo-ansioso

A frequência de entradas nos braços abertos e fechados foi semelhante entre os grupos avaliados aos 45 dias de idade ( $p = 0,1623$  e  $p = 0,0949$ , respectivamente; Figuras 2A e 2B), bem como o tempo total de permanência em ambos os braços ( $p = 0,84$ ; Figuras 2C e 2D). Assim, os animais do grupo PC não apresentaram diferenças no comportamento do tipo ansioso em relação ao grupo CT. Novamente, não houve diferença no tempo de locomoção no braço aberto em ambos os grupos estudados ( $p = 0,40$ ).

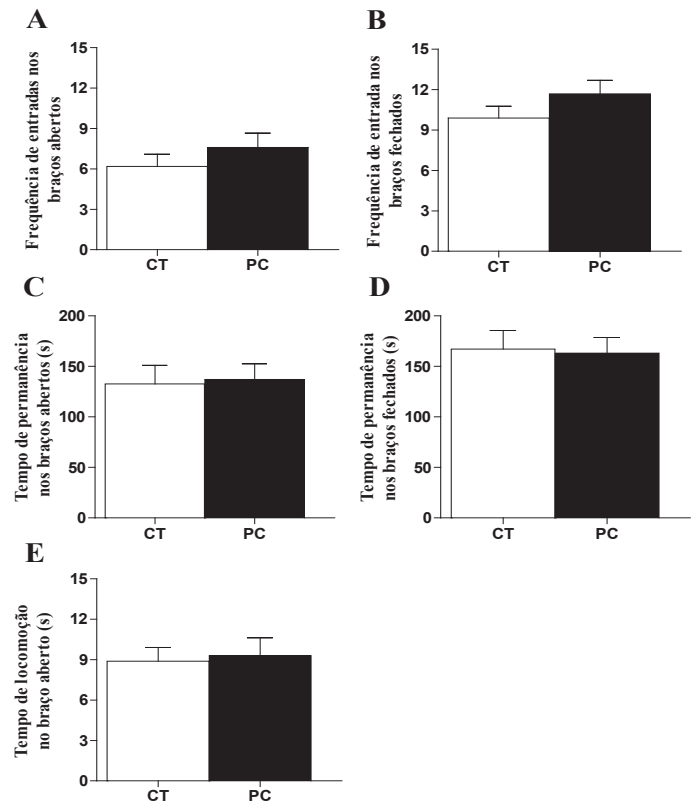


Figura 2. Efeitos da indução do modelo de paralisia cerebral sobre o comportamento do tipo ansioso de ratos, avaliado por meio do teste de labirinto em cruz elevado aos 45 dias de idade. A – Frequência de entradas nos braços abertos dos animais controle e submetidos ao modelo de PC. Teste t de Student para amostras independentes. B – Frequência de entradas nos braços fechados dos animais controle e submetidos ao modelo de PC. Teste t de Student para amostras independentes. C – Tempo gasto nos braços abertos pelos animais controle e submetidos ao modelo de PC. Teste de Mann-Whitney. D – Tempo gasto nos braços fechados pelos animais controle e submetidos ao modelo de PC. Teste de Mann-Whitney. E – Tempo total de locomoção nos braços abertos. Teste t de Student para amostras independentes. CT – Grupo Controle; PC – Grupo submetido a injeções de LPS, anóxia e restrição sensório-motora. Dados representam à média  $\pm$  erro padrão da média.

### Análise histológica

No hipocampo, os neurônios corados pela técnica de Nissl foram identificados pelo seu tamanho mais amplo e suas bordas não esféricas. A análise morfológica não evidenciou alterações nesses neurônios entre os grupos estudados (Fig. 3 A-D). Houve uma redução de aproximadamente 30% dos neurônios granulares da camada granulosa do giro denteado no grupo PC em comparação ao grupo CT ( $t = 5.4$ ;  $gl = 10$ ;  $p = 0,0002$ ; Fig. 3E).

No núcleo CeA e no complexo BLA, os neurônios apresentavam um tamanho amplo e bordas irregulares, enquanto as células da glia exibiam um tamanho reduzido, morfologia esférica e ausência de coloração no citoplasma (Fig. 4A,B). O número médio de neurônios no CeA e no



complexo BLA foi semelhante entre os grupos PC e CT ( $p = 0,06$  e  $p = 0,13$ , respectivamente; Fig. 4C,D). Também não foram verificadas diferenças significativas no número de células da glia no CeA e no BLA entre os grupos estudados ( $p = 0,47$  e  $p = 0,40$ , respectivamente; Fig. 4E,F).

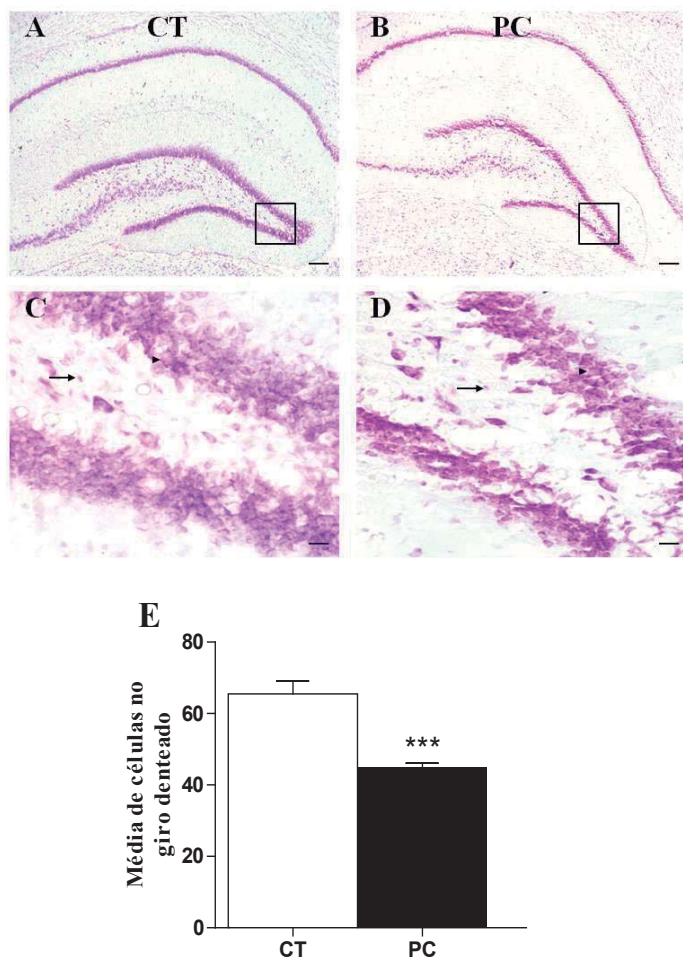


Figura 3. A, B Fotomicrografia do hipocampo dos animais dos grupos controle (CT) e submetidos ao modelo de paralisia cerebral (PC) corados pelo método de Nissl. Barra de escala representa 200  $\mu\text{m}$ . C, D Aumento da área evidenciada em A e B, mostrando a camada granulosa do giro dentado dos animais dos grupos CT e PC. Note os neurônios granulares (cabeças de seta) e as células da glia (setas). Barra de escala representa 20  $\mu\text{m}$ . E - Número médio de neurônios granulares do giro dentado do hipocampo em ratos CT e PC. \*\*\* Representa  $p < 0,0005$  quando comparado ao CT. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média. Teste t de Student para amostras independentes.

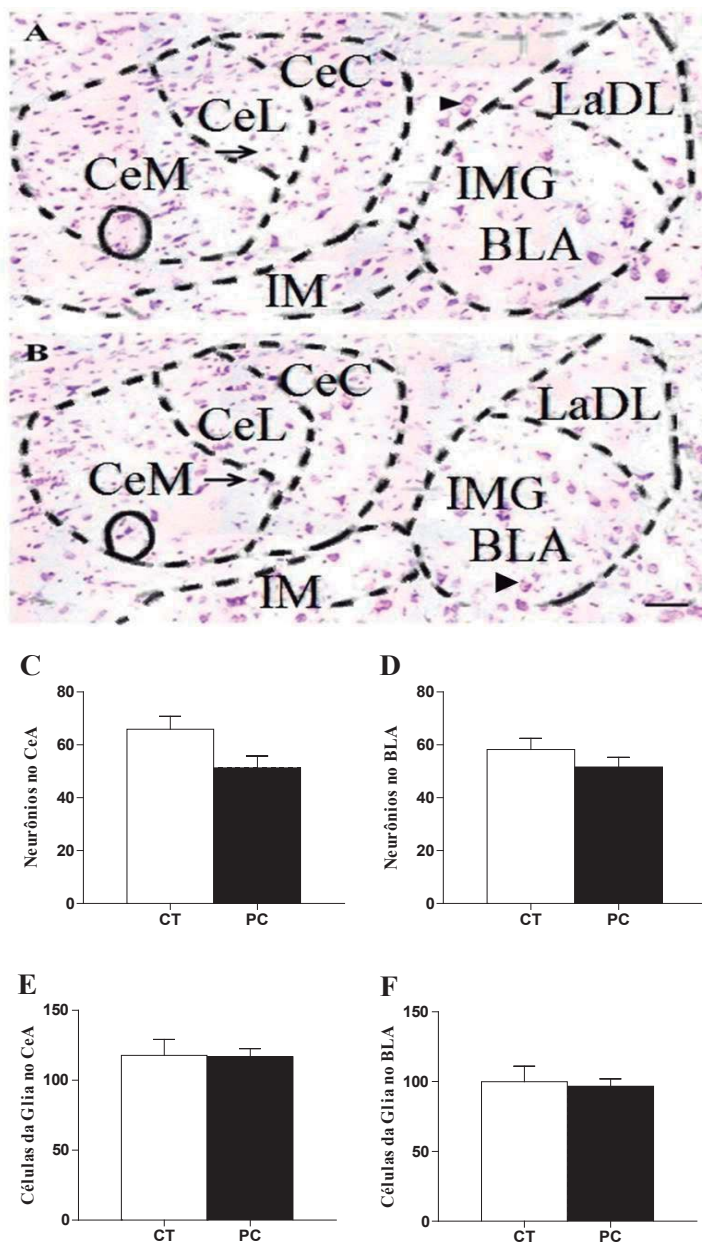


Figura 4. A, B Fotomicrografia da amígdala inferindo por sobreposição o local do núcleo central (CeA) e do complexo basolateral (BLA) da amígdala dos animais controle (CT) e submetidos ao modelo de paralisia cerebral (PC), respectivamente, corados pelo método de Nissl. Barra de escala representa 50  $\mu\text{m}$ . Note os neurônios (cabeças de seta) e as células da glia (setas). C - Número de neurônios no CeA da amígdala dos animais CT e PC. Teste de Mann-Whitney. D - Número de neurônios no BLA da amígdala dos animais CT e PC. Teste t de Student para amostras independentes. E - Número de células da glia no CeA da amígdala dos animais CT e PC. Teste t de Student para amostras independentes. F - Número de células da glia no BLA da amígdala dos animais CT e PC. Teste t de Student para amostras independentes. Dados representam a média  $\pm$  erro padrão da média.

## DISCUSSÃO

Até o presente momento, um modelo experimental de PC que apresente todos os sinais e sintomas observados nessa condição clínica ainda não foi descrito. A administração de LPS no período pré-natal, combinada com

uma anóxia peri-natal e restrição sensório-motora produz em roedores um fenótipo motor semelhante ao observado nos pacientes com PC<sup>4</sup>. Entretanto, existe uma carência de estudos sobre as alterações cognitivas que também podem ocorrer nessa patologia, bem como sua reprodução em animais experimentais.

Roedores possuem uma preferência inata pela exploração de objetos novos ou de objetos em uma nova localização<sup>16</sup>. A aquisição da memória ocorre durante um primeiro momento de investigação dos objetos e de sua posição, enquanto a evocação dessa informação permite o reconhecimento dos objetos que foram previamente explorados<sup>17</sup>. Deste modo, ratos saudáveis despendem mais tempo na exploração de objetos posicionados em uma nova localização<sup>17</sup>. O grupo PC apresentou uma redução na preferência pela investigação do objeto realocado durante o teste de reconhecimento da localização de objetos. Sabe-se que a neuroinflamação causada pela administração de LPS afeta o reconhecimento da localização de objetos, podendo comprometer a recuperação da memória<sup>18</sup>. Roedores tratados com LPS despendem o mesmo tempo explorando objetos em uma nova posição e objetos em uma posição previamente conhecida durante a tarefa de reconhecimento da localização de objetos<sup>19</sup>.

Os animais do grupo PC também apresentaram uma redução no tempo total de investigação de ambos os objetos durante o teste de memória espacial (Fig. 1). Sabe-se que uma redução na neurogênese e no número de neurônios no hipocampo ocasiona uma diminuição da taxa de exploração de ambos os objetos<sup>20</sup>. Entretanto, esse resultado também pode estar relacionado com déficits nos níveis de motivação, onde ocorrem disfunções nos córtices perirrinal e pré-frontal<sup>21</sup>.

A análise histológica do hipocampo revelou que esse modelo de PC produziu uma diminuição do número de neurônios granulares do giro denteado. Tal redução pode estar relacionada com os déficits de memória espacial observados, tendo em vista que esse tipo de memória depende do hipocampo. A perda de neurônios hipocámpais observada no presente estudo pode estar relacionada ao fato de que a restrição de oxigênio produzida pela anóxia neonatal aumenta a ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), levando a produção de altos níveis de óxido nítrico (NO). Essa substância inibe uma das enzimas responsáveis pela respiração celular, a citocromo-oxidase<sup>22</sup>. Essa inibição causa uma despolarização do neurônio e a liberação exacerbada de glutamato, levando ao desenca-

deamento do fenômeno da excitotoxicidade<sup>23</sup>.

Além disso, o hipocampo possui uma elevada densidade de receptores para citocinas pró-inflamatórias, sendo considerada uma estrutura vulnerável a neuroinflamação. Mais especificamente, o giro denteado possui uma alta densidade de receptores para Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )<sup>24</sup>. Sabe-se que a administração de LPS em ratas prenhas aumenta a expressão de IL-1 $\beta$  nos filhotes<sup>25</sup>. Assim, a ação desta citocina sobre o giro denteado durante o período gestacional pode ter comprometido a viabilidade neuronal e a retenção de memórias dependentes do hipocampo.

Cabe salientar que as alterações comportamentais observadas no teste de reconhecimento da localização de objetos não estão relacionadas a uma limitação motora, uma vez que não houve diferenças no tempo total de locomoção entre os grupos PC e CT. Apesar da restrição sensório-motora imposta aos animais do grupo PC limitar as experiências precoces essenciais para o desenvolvimento motor normal, a retirada dessa restrição 17 dias antes da realização desse teste comportamental pode ter permitido uma recuperação locomotora parcial (Fig. 1 e 2).

No teste de labirinto em cruz elevado, o número de entradas e o tempo gasto pelos animais do grupo PC nos braços abertos e fechados foi semelhante em relação ao CT. Nesta avaliação comportamental, considera-se que o animal apresenta um comportamento do tipo ansioso quando a frequência de entradas e o tempo gasto nos braços abertos são reduzidos<sup>11</sup>. Esse resultado mostra que os animais do grupo PC exibiram níveis de ansiedade similares ao grupo CT. Roedores possuem uma aversão inata a ambientes elevados do chão e a espaços abertos para evitar predadores, o que explica a permanência e a entrada reduzida nos braços abertos de ambos os grupos estudados<sup>26</sup>.

Danos na amígdala são correlacionados com transtornos de ansiedade e depressão em humanos. Entretanto, existe uma carência de estudos em relação a possíveis disfunções da amígdala em pacientes com PC. O modelo experimental utilizado neste estudo, não causou morte neuronal nos núcleos CeA e no BLA da amígdala e não alterou o número de células da glia nessas regiões. Sabe-se que no núcleo CeA da amígdala existe uma predominância de neurônios GABAérgicos<sup>9</sup>, enquanto no BLA existe um número maior de neurônios glutamatérgicos<sup>27</sup>. Estudos prévios mostram que concentrações elevadas de IL-1 $\beta$ , que podem ter sido produzidas pela administração de LPS no grupo PC, facilitam a transmissão GABAérgica no CeA<sup>28</sup>. Entretanto, a IL-1 $\beta$  afeta apenas uma parte dos neurônios

na amígdala, devido à heterogeneidade dos tipos celulares encontrados nessa estrutura e pela baixa expressão de receptores para essa interleucina<sup>29</sup>. Além disso, o aumento das células da glia, que frequentemente ocorre em resposta a lesões focais em outras estruturas encefálicas, parece não ocorrer na amígdala<sup>30</sup>. Esses achados podem explicar porque o modelo de PC que associa a administração peri-natal de LPS, anóxia neonatal e a restrição sensório-motora produz danos à memória espacial e lesões neuronais no giro denteado do hipocampo, mas não altera o comportamento do tipo ansioso e os núcleos CeA e BLA da amígdala em roedores.

## CONCLUSÃO

A combinação das injúrias utilizadas neste modelo de PC produziu déficits na memória espacial e uma redução no número de neurônios granulares do giro denteado de ratos, mimetizando prejuízos que podem ser verificados em pacientes com PC. Entretanto, este modelo não alterou os níveis de ansiedade nesses animais e não houveram mudanças histológicas em regiões da amígdala responsáveis pelo processamento deste tipo de comportamento. Portanto, este modelo de PC é válido para o estudo de déficits de memórias dependentes do hipocampo em pacientes com PC, mas não deve ser adotado para a compreensão de alterações nos níveis de ansiedade que podem ser verificados nessa condição clínica.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Ana Tereza Bittencourt Guimarães pelo auxílio na análise estatística dos dados, à Fundação Araucária pelo apoio financeiro e à UNIOESTE pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento deste estudo.

## CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## SUPORTE FINANCEIRO

Fundação Araucária e Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

## REFERÊNCIAS

- Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, et al. Proposed definition and classification of cerebral palsy. *Dev. Med. Child. Neurol.* 2005/08/20; 47:571-576.
- Cowan F, Rutherford M, Goenendaal F, et al. Origin and timing of brain lesions in term infants with neonatal encephalopathy. *Lancet.* 2003/03/07; 361:736-742.
- Surveillance of cerebral palsy in Europe. Surveillance of cerebral palsy in Europe: a collaboration of cerebral palsy surveys and registers. *Dev Med Child Neurol.* 2000/12/29; 42:816-24.
- Stigger F, Felizzola AL, Kronbauer GA, et al. Effects of fetal exposure to lipopolysaccharide, perinatal anoxia and sensorimotor restriction on motor skills and musculoskeletal tissue: implications for an animal model of cerebral palsy. *Exp Neurol.* 2011/01/18; 228:183-91.
- Buwalda B, Nyakas C, Vosselman HJ, Luiten PG. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. *Behav Brain Res.* 1995/02/01; 67:85-90.
- Coq JO, Strata F, Russier M, et al. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. *Exp Neurol.* 2007/12/07; 210:95-108.
- Frampton I, Yude C, Goodman R. The prevalence and correlates of specific learning difficulties in a representative sample of children with hemiplegia. *Br J Educ Psychol.* 1998/05/20; 68: 39-51.
- Riedel G, Micheau J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2001/06/01; 25:835-853.
- Janak PH, Tye KM. From circuits to behaviour in the amygdale. *Nature.* 2015/01/17; 517:284-92.
- Piazza FV, Segabinazi E, Centenaro LA, et al. Enriched environment induces beneficial effects on memory deficits and microglial activation in the hippocampus of type 1 diabetic rats. *Metab Brain Dis.* 2013/12/10; 29:93-104.
- Pellow S, File ES. Anxiolytic and Anxiogenic Drug Effects on Exploratory Activity in an Elevated Plus-Maze: a Novel Test of Anxiety in the Rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986/03/01; 24:525-529.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4 edição. San Diego: Academic Press; 1998.
- Marcuzzo S, Dutra MF, Stigger F, et al. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain Dev.* 2009/05/27; 32:323-31.
- Lopez-Galindo GE, Cano-Europa E, Ortiz-Butron R. Ketamine prevents lidocaine-caused neurotoxicity in the CA3 hippocampal and basolateral amygdala regions of the brain in adult rats. *J Anesth.* 2008/11/18; 22:471-474.
- Konopaske GT, Dorph-Petersen KA, Pierri JN, et al. Effect of chronic exposure to antipsychotic medication on cell numbers in the parietal cortex of macaque monkeys. *Neuropsychopharmacology.* 2006/10/26; 32:1216-223.
- Forwood SE, Bartko SJ, Saksida LM, Bussey TJ. Rats spontaneously discriminate purely visual, two-dimensional stimuli in tests of recognition memory and perceptual oddity. *Behav Neurosci.* 2007/10/03; 121:1032-42.
- Ennaceur A, Michalikova S, Bradford A, Ahmed S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. *Behav Brain Res.* 2005/04/09; 159:247-266.
- Hennigan A, Trotter C, Kelly AM. Lipopolysaccharide impairs long-term potentiation and recognition memory and increases p75NTR expression in the rat dentate gyrus. *Brain Res.* 2006/12/19; 1130:158-166.
- Czerniawski J, Yoon T, Otto T. Dissociating space and trace in dorsal and ventral hippocampus. *Hippocampus.* 2009/07/25; 19:20-32.
- Parihar VK, Hattiangady B, Shuai B, Shetty AK. Mood and memory deficits in a model of Gulf War illness are linked with reduced neurogenesis, partial neuron loss, and mild inflammation in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology.* 2013/06/29; 38:2348-362.
- Waeburton EC, Barker GR, Brown MW. Investigations into involvement of NMDA mechanisms in recognition memory. *Neuropharmacology.* 2013/05/15; 74:41-47.
- Bal-Price A, Brown GC. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *J Neurosci.* 2001/08/23; 21:6480-491.
- Jekabsone A, Neher JJ, Borutaite V, Brown GC. Nitric oxide from neuronal nitric oxide synthase sensitises neurons to hypoxia-induced death via competitive inhibition of cytochrome oxidase. *J Neurochem.* 2007/07/12; 103:346-356.
- Ban E, Milon G, Prudhomme N, Fillion G, Haour F. Receptors for interleukin-1 (alpha and beta) in mouse brain: mapping and neuronal localization in hippocampus. *Neuroscience.* 1991/01/01; 43:21-30.
- Bosshart H, Heinzelmann M. Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. *Ann N Y Acad Sci.* 2007/04/05; 1096:1-17.
- Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988/12/01; 31:959-962.
- Mcdonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.* 1998/06/27; 55:257-332.

28. Wong ML, Licinio J. Localization of interleukin 1 type I receptor mRNA in rat brain. *Neuroimmunomodulation*. 1994/03/01; 1:110-115.
29. Chieng BC, Christie MJ, Osborne PB. Characterization of neurons in the rat central nucleus of the amygdala: cellular physiology, morphology, and opioid sensitivity. *J Comp Neurol*. 2006/06/28; 497:910-927.
30. Hamidi M, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes. *Biol Psychiatry*. 2004/03/12; 55:563-569.