

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DISTÚRBIOS DA
COMUNICAÇÃO HUMANA**

**GENOTOXICIDADE E EQUOTERAPIA NO CONTROLE
POSTURAL DE PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação de Mestrado

Karla Mendonça Menezes

Santa Maria, 2011

Genotoxicidade e Equoterapia no controle postural de portadores de Esclerose Múltipla

por

Karla Mendonça Menezes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração Fonoaudiologia e Comunicação Humana: Clínica e Promoção, linha de Pesquisa em Audição e Equilíbrio: diagnóstico, habilitação e reabilitação da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS)

Orientador: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Copetti

Santa Maria, RS, Brasil

2011

- M543g Menezes, Karla Mendonça
Genotoxicidade e equoterapia no controle postural de portadores de esclerose múltipla / por Karla Mendonça Menezes. – 2011.
71 f. ; il. ; 30 cm
- Orientador: Aron Ferreira da Silveira
Coorientador: Fernando Copetti
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, RS, 2011
1. Esclerose múltipla 2. Genotoxicidade 3. Equoterapia 4. Controle postural
5. Dano ao DNA I. Silveira, Aron Ferreira da II. Copetti, Fernando III. Título.
- CDU 616.83-004

Ficha catalográfica elaborada por Cláudia Terezinha Branco Gallotti – CRB 10/1109
Biblioteca Central UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação
Humana**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**GENOTOXICIDADE E EQUOTERAPIA NO CONTROLE POSTURAL
DE PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA**

elaborada por
Karla Mendonça Menezes

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana

COMISSÃO EXAMINADORA:

Aron Ferreira da Silveira, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Ana Cristina de David, Dr^a. (UNB)

Angela Garcia Rossi, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 03 de março de 2011.

AGRADECIMENTOS

Quando um trabalho chega ao final, um exercício fascinante a se fazer é olhar para trás e identificar quem foram as partes essenciais deste. E neste sentido, trago aqui meu reconhecimento a pessoas e órgãos que foram fundamentais para a execução desse estudo e para a concretização de muitos dos meus objetivos acadêmicos.

Inicialmente agradeço a *Universidade Federal De Santa Maria*, instituição que eu tenho orgulho e respeito irrestritos, por todos os subsídios concedidos para minha formação pessoal e profissional desde a graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana pela oportunidade de executar esse estudo. Aos docentes pela contribuição e aos funcionários pela disposição e amizade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira, por ter me recebido de braços abertos. Pela confiança, disposição, amizade, dedicação e pelo convívio sempre agradável.

À CAPES pelo bolsa concedida.

Ao Laboratório de Biogenômica do Desenvolvimento e Envelhecimento pelo apoio técnico. Em especial, à farmacêutica Thais Doeler Algarve pela paciência e à Prof. Dr. Ivana Beatrice Manica da Cruz por todos os ensinamentos e energia contagiante.

Ao Centro de Educação Física e Desportos e ao Laboratório de Pesquisa e Ensino do Movimento Humano, pela parceria, cooperação e suporte para realização das coletas. Em especial, ao Prof. Dr. Carlos Bolli Motá e aos integrantes do LABIOMECC pelo apoio, paciência e ensinamentos infindáveis. Ao Prof. Me. Matheus Joner Wiest pela parceria desde a graduação, pelo auxílio no processamento dos dados e por

me ensinar que não precisamos saber tudo enquanto tivermos amigos que sabem (=D).

Ao Prof. Dr. Fernando Copetti, pela confiança. Pela amizade. Por ser essa pessoa linda, sorridente, acessível, brilhante. Para mim, uma inspiração e exemplo de profissional. Mestre indiscutivelmente, um dos grandes responsáveis por eu estar onde estou hoje, Feliz.

Ao projeto Equoterapia, agradeço pela oportunidade de conhecer uma área de atuação apaixonante. À Prof^a. Dr^a. Cláudia Trevisan por todos os ensinamentos. Às fisioterapeutas Cristiane Schmitt e Fabiana Moraes pela amizade, pelas risadas e pela companhia agradável, seja nos momentos de estudo ou de lazer.

Por fim, agradeço a minha família e nela incluo meus amigos, pela compreensão nos momentos de ausência e pela alegria dividida. E ao meu melhor amigo-Amor, Gustavo, por ser meu porto seguro, minha inspiração e minha força.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos integrantes da Associação de Portadores de Esclerose Múltipla de Santa Maria e região (APEMSMAR). Vocês, antes de tudo, foram a essência desse estudo e, com o passar do tempo se tornaram, para mim, exemplos de superação. Com vocês aprendi que precisamos olhar mais ao nosso redor e amar a vida pelo que ela nos é. Porque afinal, “o importante é viver bem” (by APEMSMAR).

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana
Universidade Federal de Santa Maria

GENOTOXICIDADE E EQUOTERAPIA NO CONTROLE POSTURAL DE PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA

Autor: Karla Mendonça Menezes
Orientador: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Copetti
Data e Local: Santa Maria, 03 de março de 2011.

Introdução: A Esclerose Múltipla (EM) é uma neuropatologia crônica caracterizada pela infiltração de células inflamatórias no Sistema Nervoso Central (SNC). Alguns estudos tem sugerido que danos cumulativos ao DNA, induzidos pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), possam contribuir para vários mecanismos subjacentes às lesões da EM. Em decorrência das disfunções observadas em diferentes estruturas do SNC, as alterações no controle postural são observações frequentes em portadores de EM. Neste sentido, estudos tem evidenciado que intervenções terapêuticas, como a equoterapia, tem potencial para reduzir muitas das deficiências observadas na EM. **Objetivos:** 1) Verificar os índices de dano ao DNA de portadores de EM, 2) Verificar a relação entre os índices de danos ao DNA e parâmetros do controle postural de portadores de EM, e 3) Verificar se a Equoterapia é capaz de desencadear alterações no controle postural de portadores de EM. **Método:** Foram incluídos no estudo 14 portadores de EM com idade média de $40,7 \pm 8,3$ anos e 28 controles saudáveis com idade $35,10 \pm 15,3$ anos. O dano ao DNA foi avaliado através da versão alcalina do ensaio cometa. O controle postural foi avaliado pela estabilometria, durante 30 segundos, em postura quieta. **Resultados:** Portadores de EM apresentaram maior índice de dano de DNA ($21,3 \pm 4,8$) do que controle saudáveis ($7,9 \pm 6,1$) com $p=0,0001$. Não foram encontradas associações entre os índices de dano ao DNA e os parâmetros do controle postural. Após a estimulação da equoterapia os sujeitos com EM foram capazes de reduzir as oscilações corporais. **Conclusão:** Portadores de EM apresentam maior dano ao DNA do que controles saudáveis. A estimulação proporcionada pela equoterapia foi capaz de desencadear alterações favoráveis no controle postural de portadores de EM, podendo ser indicada como uma prática terapêutica eficiente para esta população. **Palavras-chave:** Esclerose Múltipla; Controle Postural; Dano ao DNA; Equoterapia.

ABSTRACT

Dissertation of Masters
Post-Graduate Program in Human Communication Disorders
Federal University of Santa Maria

GENOTOXICITY AND HIPPOThERAPY IN THE POSTURAL CONTROL IN PATIENTS WITH MULTIPLE SCLEROSIS

Author: Karla Mendonça Menezes
Advisor: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira
Co-supervisor: Prof. Dr. Fernando Copetti
Date and Place: Santa Maria, March 03, 2011.

Introduction: Multiple Sclerosis (MS) is a chronic neuropathology characterized by infiltration of inflammatory cells in the central nervous system (CNS). Some studies have suggested that cumulative damage to DNA, induced accumulation of reactive oxygen species (ROS) may contribute to several mechanisms underlying the lesions of MS. As a result of dysfunctions observed in different CNS structures, changes in postural control are frequent observations in MS patients. Studies have shown that therapeutic interventions such as equine therapy has the potential to reduce many of the deficiencies observed in MS.

Objectives: 1) assess the levels of DNA damage in MS patients, 2) investigate the relationship between rates of DNA damage and parameters of postural control in people with MS, and 3) Verify that hippotherapy is able to initiate changes postural control of patients with MS.

Method: The study included 14 MS patients with a mean age of 40.7 ± 8.3 years and 28 healthy controls aged 35.10 ± 15.3 years. The DNA damage was evaluated using the alkaline version of the comet assay. The postural control was assessed by stabilometry for 30 seconds in quiet stance. Results: Patients with MS had higher rates of DNA damage (21.3 ± 4.8) than healthy controls (7.9 ± 6.1) with $p = 0.0001$. We found no association between rates of DNA damage and the parameters of postural control. After stimulation of hippotherapy, subjects with MS were able to reduce body oscillations.

Conclusion: MS patients showed more DNA damage than healthy controls. Hippotherapy can be recommended for rehabilitation of postural control in subjects with MS.

Keywords: Multiple Sclerosis; Postural Control; DNA Damage; Hippotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Influência das informações sensoriais no controle postural.....	20
Figura 2 - Classificação do Dano ao DNA dos indivíduos analisados.....	27
Figura 3 - Plataforma de força OR6-7 AMTI: dimensões e sistemas de referência..	27

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	63
Anexo B - Termo de Confidencialidade.....	65
Anexo C - Anamnese	66
Anexo D - Protocolo Teste Cometa.....	67

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
DEDICATÓRIA.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE ANEXOS	xi
SUMÁRIO.....	xii
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivos Gerais	15
1.2 Objetivos Específicos	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Esclerose Múltipla.....	17
2.2 Espécies reativas de oxigênio e danos oxidativos ao DNA	18
2.3 Utilização do Ensaio Cometa para quantificar os danos ao DNA.....	19
2.4 Controle Postural	21
2.5 Uso da Estabilometria para avaliação do Equilíbrio Postural	22
2.6 Utilização de estratégias de reabilitação para portadores de EM.....	23
2.7 A Equoterapia como método de intervenção	24
3 METODOLOGIA.....	26
3.1 Delineamento.....	26
3.2 Grupo de Estudos.....	26
3.3 Procedimentos.....	26
3.4 Avaliação dos índices de dano ao DNA	27
3.5 Avaliação do Controle Postural	28
3.6 Intervenção através da Equoterapia.....	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Artigo de Pesquisa I - Dano ao DNA e controle postural de portadores de.....	31
Esclerose Múltipla.....	31
4.2 Artigo de Pesquisa II - Controle postural de portadores de Esclerose Múltipla submetidos à Equoterapia	41
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7 ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma neuropatologia crônica caracterizada pela infiltração de células inflamatórias no Sistema Nervoso Central (SNC) (LANA-PEIXOTO, 2002; KORNECK, LASSMANN, 2003; CALABRESI, 2004; BCTRIMS, 2010). Os fatores que influenciam o surgimento dessa patologia ainda não foram elucidados, contudo a hipótese patogênica mais aceita é que a EM seja fruto de uma predisposição genética associada a um fator ambiental desconhecido que, ao se encontrarem desencadeiam uma disfunção no sistema imune (KORNECK; LASSMANN, 2003).

Estudos epidemiológicos tem admitido que a EM geralmente surja no início da idade adulta e seja, atualmente, a causa mais comum de incapacidade física adquirida em muitos países da América do Norte e Europa (DEBOLT, MCCUBBIN, 2004; FINKELSZTEJN *et al.*, 2009). No Brasil, a distribuição e a caracterização clínica da EM ainda não foram estabelecidas. Recentes estudos revelaram taxas de 15 casos/100.000 habitantes, nas regiões sul e sudeste (PAPAI-ALVARENGA *et al.*, 1995; CALLEGARO *et al.*, 2001; GRZESIUK, 2006; FINKELSZTEJN *et al.*, 2009).

Estudiosos das mais variadas áreas do conhecimento tem se dedicado a observar os fatores que estão envolvidos com o surgimento da EM. Alguns desses estudos tem sugerido o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode contribuir para vários mecanismos subjacentes às lesões da EM (VAN DER GOES *et al.*, 1998; LU *et al.*, 2000; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2004; VAN HORSSSEN *et al.*, 2008). Apesar das espécies EROs, muitas vezes designadas como radicais livres, serem subprodutos normais do metabolismo aeróbico celular, essas moléculas podem prejudicar lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Assim, os danos cumulativos causados ao material genético (DNA, ácido desoxirribonucleico), induzidos pela incidência de moléculas EROs, resultariam no declínio no desempenho fisiológico das células afetadas (COOKE *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2004; D'ERRICO *et al.*, 2008; DRUZHYNNA *et al.*, 2008). Estudos sugerem que as EROs desempenham um papel importante no envelhecimento normal e patológico, nas doenças auto-imunes e neurodegenerativas (BOHR *et al.*, 1998; COOKE *et al.*,

2003; EVANS *et al.*, 2004; KADLOGLU *et al.*, 2004; RAO, 2009; REDDY *et al.*, 2009). Dentre eles, há evidências de que as EROs possam contribuir para vários mecanismos subjacentes às lesões da EM como a fagocitose de mielina e desagregação por macrófagos (VAN DER GOES *et al.* 1998; KORNECK, LASSMANN, 2003; GILGUN-SHERKI *et al.* 2004), o dano oligodendroglial (VAN HORSSSEN *et al.*, 2008) e lesão neuronal e axonal (KORNECK, LASSMANN, 2003; GILGUN-SHERKI *et al.* 2004).

Como consequência desse conjunto de disfunções, a EM geralmente tem caráter heterogêneo e tende a evoluir através de episódios de surto-remissão resultando em formas clínicas distintas, conforme a localização das lesões (LASSMANN, LUCCHINETTI, 2001; KORNECK, LASSMANN, 2003; CALABRESI, 2004). Essas lesões provocam uma gama de sinais neurológicos que comprometem as atividades funcionais. Entre elas, as alterações nos mecanismos de controle postural são observações frequentes em portadores de EM (FRZOVIC *et al.*, 2000; CATTANEO *et al.*, 2002; KARST *et al.*, 2005; PETERSON, CHO, FINLAYSON, 2007; CHUNG *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2008; CATTANEO, JONSDOTTIR, 2009; POROSIŃSKA *et al.*, 2010; VAN EMMERIK *et al.*, 2010).

O controle postural é o resultado de complexas interações entre os sistemas músculo-esqueléticos e neuromusculares, incluindo componentes sensoriais como a visão, os sistemas proprioceptivo e vestibular (KESHNER, 2002; SHUMWAY-COOK, WOOLLACOTT, 2003).

Em indivíduos com EM, Reulen *et al.* (1983) observou-se que o sistema visual pode ser perturbado por placas no nervo óptico levando à cegueira, visão turva ou diplopia, o envolvimento das vias vestibulares, foi identificado por Williams *et al.* (1997) e, além disso, distúrbios de propriocepção, espasticidade e fraqueza muscular, também observados (CALABRESI, 2004; DEBOLT, MCCUBBIN, 2004; ROMBERG *et al.*, 2004; CHUNG *et al.*, 2008; SOSNOFF *et al.*, 2010).

A EM ainda não possui cura e o tratamento dessa doença, normalmente se restringe a aplicação de drogas imunossupressoras e imunomoduladoras (LASSMANN, LUCCHINETTI, 2001; KORNECK, LASSMANN 2003; CALABRESI, 2004; BCTRIMS, 2010), no entanto, alguns estudos tem evidenciado que intervenções terapêuticas tenham potencial para melhorar muitas das deficiências observadas na EM (DEBOLT, MCCUBBIN, 2004; ROMBERG *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2007; CATTANEO *et al.*, 2007; CATTANEO, JONSDOTTIR, 2009). Nesse

contexto, as atividades de estimulação equestre, no Brasil inseridas no contexto da Equoterapia (ANDE-Brasil, 2010), vem sendo utilizadas como método terapêutico complementar em uma série de condições neurológicas incluindo lesão da medula espinhal (LECHNER *et al.*, 2003; LECHNER *et al.*, 2007), paralisia cerebral (BERTOTI, 1988; BIERY, KAUFFMAN, 1989; MCGIBBON *et al.*, 1998; BENDA *et al.*, 2003; CASADY, NICHOLS-LARSEN, 2004; CHERNG *et al.*, 2004; HAMILL *et al.*, 2007; MCGIBBON *et al.*, 2009) e Esclerose Múltipla (HAMMER *et al.*, 2005; SILKWOOD-SHERER, WARMBIER, 2007)

Assim, considerando as evidências de que espécies reativas de oxigênio (EROs) podem contribuir para mecanismos subjacentes às lesões da EM e as frequentes observações de comprometimento no controle postural de portadores de EM, esse estudo estabeleceu os seguintes objetivos:

1.1 Objetivos Gerais

Verificar os indicadores de Genotoxicidade e a influência da Equoterapia no controle postural de portadores de EM.

1.2 Objetivos Específicos

Verificar os índices de dano ao DNA de portadores de EM, através do Ensaio Cometa;

Comparar os índices de dano ao DNA de portadores de EM com o índice de dano ao DNA de controles saudáveis;

Avaliar os parâmetros do controle postural, de portadores de Esclerose Múltipla, através da estabilometria;

Comparar os parâmetros do controle postural dos portadores de EM conforme histórico de instabilidade postural;

Verificar se um período de estimulação, através da Equoterapia, é capaz de desencadear alterações no controle postural de portadores de EM.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Esclerose Múltipla

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença neurológica crônica, de caráter geralmente progressivo, que resulta em consequentes e variáveis déficits causados por lesões focais à mielina que podem dificultar e, até mesmo, interromper a transmissão de impulsos nervosos, ou acarretar falhas na propagação de potenciais de ação axonais (COOK, 1990; FURTADO; TAVARES, 2006). Durante esse processo de desmielinização formam-se placas ou tecidos endurecidos, semelhantes a cicatrizes. Essas placas podem aparecer em distintas áreas do cérebro e medula espinhal, sendo esta a origem do nome Esclerose Múltipla.

Acredita-se, que as lesões a camada de mielina sejam mediadas pelo sistema imunológico havendo, contudo, uma relativa preservação de outros elementos do tecido nervoso (MILLER, 1990; COOK, 1990). Em reflexo dos diferentes mecanismos responsáveis pela destruição da mielina, a EM geralmente tem caráter heterogêneo e tende a evoluir através de episódios de surto-remissão resultando em formas clínicas distintas, dependendo da localização das lesões (LASSMANN, LUCCHINETTI, 2001; KORNECK, LASSMANN, 2003; CALABRESI, 2004).

Essas lesões provocam uma gama de sinais neurológicos que comprometem as atividades funcionais podendo incluir excessiva fadiga e fraqueza muscular (PALTAMAA *et al.*, 2007), espasticidade (SOSNOFF *et al.*, 2010) e alterações no controle postural (FRZOVIC *et al.*, 2000; CATTANEO *et al.*, 2002; KARST *et al.*, 2005; PETERSON, CHO, FINLAYSON, 2007; CHUNG *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2008; CATTANEO, JONSDOTTIR, 2009; POROSIŃSKA *et al.*, 2010; VAN EMMERIK *et al.*, 2010), entre outros.

Devido a sintomatologia variada, ainda não há consenso entre os estudiosos quanto à classificação de suas formas. Em 1996, Lublin e Reingold classificaram, através de um consenso internacional, as formas de evolução da doença em: 1) Recorrente-remitente (RR) – evolui em surtos bem individualizados não havendo progressão dos déficits entre os surtos podendo deixar ou não sequelas; 2)

Secundariamente progressiva (SP) caracterizada por uma fase precedente de recorrências e remissões seguida de progressão dos déficits sem surtos, ou com surtos subjacentes; 3) Primariamente progressiva (PP) caracterizada desde o início por doença progressiva evoluindo com ocasionais estabilizações e discretos períodos de melhora; 4) Progressiva-recorrente (PR) caracteriza-se, desde o início, por doença progressiva, porém intercalada por surtos claramente objetivos, com ou sem recuperação total. Já para Callegaro *et al.* (2001) é possível identificar apenas dois cursos bem distintos: quando os sintomas e sinais neurológicos são transitórios denomina-se curso remitente-recorrente e, quando o quadro neurológico se torna mais sistematizado, ou seja, os sintomas e sinais neurológicos se intensificam, sem remissão, resultando em comprometimento motor, classifica-se como curso progressivo.

A EM é o principal membro de um grupo de distúrbios conhecidos como doenças desmielinizantes (FRANKEL, 2004). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), afeta cerca de 2,5 milhões de pessoas no mundo. Embora a distribuição e a caracterização clínica da EM no Brasil ainda não sejam bem conhecidas, recentes estudos revelaram taxas de 15/100.000 (PAPAI-ALVARENGA *et al.*, 1995; CALLEGARO *et al.*, 2001; GRZESIUK, 2006; FINKELSZTEJN *et al.*, 2009). Geralmente o diagnóstico da EM se dá entre os 20 e 40 anos de idade, havendo maior prevalência de casos no sexo feminino, em uma proporção de 2:1 (CALLEGARO *et al.*, 2001).

2.2 Espécies reativas de oxigênio e danos oxidativos ao DNA

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são espécies químicas presentes na maioria dos sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O (VALKO *et al.*, 2006). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SCANDALIOS, 2005). Caracterizados pela instabilidade, vida curta e sendo muito reativos quimicamente, eles tendem a ligar-se com outros elétrons em estruturas próximas de sua formação

comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons (VASCONCELOS *et al.* 2007; RAO, 2009).

Apesar das espécies EROs, muitas vezes designadas como radicais livres, serem subprodutos normais do metabolismo aeróbico celular, essas moléculas podem prejudicar lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (ANDERSON, 1996; EVANS *et al.*, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Estas lesões podem ser induzidas não apenas pelas EROs, geradas pela exposição a agentes exógenos, mas também por fontes endógenas, que incluem o metabolismo de oxigênio, apoptose e respostas inflamatórias que envolvem o sistema imune (BARREIROS, 2006; VANCONCELOS, 2007). Normalmente, a taxa de lesões induzidas pela formação de EROs é equilibrada por sua taxa de reparo. No entanto, a exposição crônica ao estresse oxidativo, devido a deficiências nos processos de reparação celular, ou mudanças no potencial mitocondrial, podem induzir a mutagênese e a perda da homeostase (RAO, 2009).

Os danos cumulativos causados ao material genético (DNA, ácido desoxirribonucleico), induzidos pela incidência de moléculas EROs, resultariam no declínio no desempenho fisiológico das células afetadas (COOKE *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2004; D'ERRICO *et al.*, 2008; DRUZHYNA *et al.*, 2008). Alguns estudos sugerem que as EROs desempenham um papel importante no envelhecimento normal e patológico, nas doenças auto-imunes e neurodegenerativas (BOHR *et al.*, 1998; COOKE *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2004; KADLOGLU *et al.*, 2004; RAO, 2009; REDDY *et al.*, 2009). Dentre eles, há evidências de que as EROs possam contribuir para vários mecanismos subjacentes às lesões da EM como a fagocitose de mielina e desagregação por macrófagos (VAN DER GOES *et al.* 1998; KORNECK, LASSMANN, 2003; GILGUN-SHERKI *et al.* 2004), o dano oligodendroglial (VAN HORSSSEN, *et al.*, 2008) e lesão neuronal somato e axonal (KORNECK, LASSMANN, 2003; GILGUN-SHERKI *et al.* 2004).

2.3 Utilização do Ensaio Cometa para quantificar os danos ao DNA

O ensaio cometa (Single Cell Gel Electrophoresis) é um teste de genotoxicidade capaz de identificar agentes que causam mudança no genoma e

detectar danos ao DNA induzidos por agentes alquilantes e/ou oxidantes (SINGH *et al.*, 1988, HARTMANN, 2003). Essa técnica é capaz de medir lesões ao DNA pela migração de fragmentos, após a ação de agentes genotóxicos (ROSS *et al.*, 1995, SINGH *et al.*, 1988; ÖSTLING; JOHANSON, 1984).

O teste do cometa baseia-se no princípio da eletroforese, onde uma suspensão de células a serem analisadas é colocada numa fina camada de gel de agarose sobre uma lâmina histológica e submetidas à eletroforese (HARTMANN, 2003; FARBARIRN, 1995). A eletroforese permite que os fragmentos de DNA, que têm carga negativa (-) migrem em direção ao anodo (+). Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (COLLINS *et al.*, 1995).

Östling, Johanson (1984) afirmam, que a distância de deslocamento em direção ao anodo é diretamente relacionada com a intensidade de dano causado. No entanto, há um consenso de que a simples visualização do “cometa” já significa que danos estão presentes ao DNA. A identificação do dano ao DNA pode ser feita por diferentes maneiras como, por exemplo, medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, ou ainda, classificar visualmente, em diferentes níveis de dano, as células analisadas, podendo-se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral sofrido por uma população de células (COLLINS *et al.*, 1995).

Os danos ao DNA podem ser induzidos por um grande número de agentes físicos e químicos do ambiente, bem como por compostos produzidos pelo metabolismo celular (EVANS *et al.*, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2007; D'ERRICO *et al.*, 2008). Muitas evidências tem sugerido, que os danos ao DNA, resultantes do acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs), muitas vezes designadas como radicais livres, contribuam para diversas condições clínicas (COOKE *et al.*, 2003; D'ERRICO *et al.*, 2008;; SEDELNIKOVA *et al.* 2010). Alguns estudos tem sugerido, que as EROs desempenham um papel importante no envelhecimento normal e patológico, nas doenças auto-imunes e neurodegenerativas (BOHR *et al.*, 1998; COOKE *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2004; KADLOGLU *et al.*, 2004; RAO, 2009; REDDY *et al.*, 2009).

2.4 Controle Postural

O controle postural tem sido definido como uma habilidade motora complexa, resultante da interação entre múltiplos processos sensório-motores, que fornecem informações sobre a orientação do corpo no espaço e permitem a manutenção do equilíbrio corporal (KESHNER, 2002; SHUMWAY-COOK, WOLLACOTT, 2003). Cada sistema sensorial oferece ao Sistema Nervoso Central (SNC) informações específicas sobre a posição e o movimento do corpo. Essas informações são recebidas pelos sensores somatossensorial, vestibular e visual, conforme ilustra a Figura 1. O SNC por sua vez solicita a contribuição dos sistemas neuromuscular e músculo-esquelético que vão integrar as informações sensoriais e gerar mecanismos adequados para a manutenção do equilíbrio corporal (SHUMWAY-COOK, WOLLACOTT, 2003).

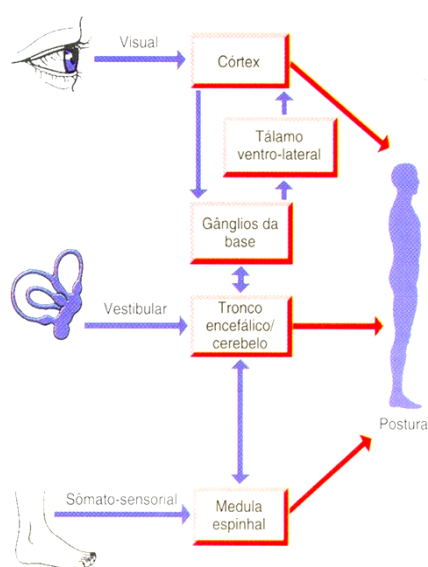


Figura 1 – Influência das informações sensoriais no controle postural.

Fonte: Lundy-Ekman, 2008.

O nível de controle aportado por cada sistema, em diferentes situações, ainda não foi estabelecido, no entanto, há evidências de que indivíduos saudáveis, num ambiente bem iluminado, com uma superfície estável, confiam aproximadamente 70% em informações provenientes do sistema somatossensorial, 20% em informações vestibulares e 10% nas informações visuais, para manter a postura quase-estática (PETERKA *et al.*, 2002).

O comprometimento de qualquer componente desses sistemas pode resultar em diminuição do controle postural. Keshner (2002) salienta que quando um desses sinais é comprometido há uma restauração central na tentativa de reorganizar o circuito neural, desencadeando assim, reações posturais, mesmo que alteradas, utilizando as informações sensoriais remanescentes. David (2002) complementa que, quando, se fazem necessárias adaptações, mecanismos de compensação são invocados a fim de orientar a resposta motora substituindo uma resposta alternativa (alterada) por uma resposta habitual de compensação.

2.5 Uso da Estabilometria para avaliação do Equilíbrio Postural

A Estabilometria é a medida ou registro das contínuas oscilações ântero-posteriores e laterais do corpo humano com um indivíduo sobre uma plataforma de força (DUARTE, 2000). A plataforma de força mede a força de reação do solo em relação à resultante das forças aplicadas, sendo a localização desta resultante correspondente ao centro de pressão (COP). O princípio físico envolvido consiste em considerar o deslocamento do COP sobre a plataforma de força, refletindo a atuação dos mecanismos de controle postural (BARELA, 2006).

A avaliação estabilométrica faz uso de uma plataforma de força AMTI, triaxial, montada em uma base sólida contendo sensores, colocados em posições pré-determinadas para que possa ser registrada a força em três planos (X, Y, Z).

Observações direcionadas a pessoas sem histórico de neuropatias sugerem que existem dois mecanismos ortogonais que controlam o COP. Enquanto as oscilações na direção A-P são, em grande parte, controladas pela estratégia do tornozelo (principalmente pelos flexores plantares), as oscilações na direção médio-lateral (M-L) são controladas pela estratégia do quadril (WINTER *et al.* 1996; WINTER *et al.* 2003)

Ao analisar diferentes métodos de avaliação, Berg *et al.* (1992) observou, que testes laboratoriais parecem mais sensíveis do que testes clínicos na identificação de déficits sutis no controle postural. Nesse contexto, Karst *et al.* (2005) sugere, que a mensuração COP é capaz de perceber alterações sutis no controle postural de indivíduos com EM e parece ser um instrumento adequado para quantificar

mudanças no controle postural ao longo do tempo ou em resposta à intervenção de indivíduos com EM.

2.6 Utilização de estratégias de reabilitação para portadores de EM

Vários estudiosos tem se dedicado a avaliar a eficácia de diferentes programas de exercícios terapêuticos em indivíduos com EM.

Rodgers et al. (1999) observaram que seis meses de treinamento aeróbico foram capazes de melhorar a capacidade aeróbica, mas teve pouco efeito sobre os parâmetros da marcha em pacientes com EM.

Romberg et al. (2004) mostraram, que em um programa de exercícios resistidos, realizados durante seis meses, o equilíbrio estático de indivíduos com EM não foi influenciado. Resultados similares foram observados por De Bolt, McCubbin (2004) quando, após um programa de exercícios resistidos para os membros inferiores, realizados durante oito semanas, o aumento da força muscular não foi capaz de alterar o equilíbrio e mobilidade dos sujeitos investigados.

Pavan *et al.* (2007), avaliaram o equilíbrio postural, através da escala de equilíbrio de Berg, de quatro sujeitos com EM, submetidos a um programa de reabilitação vestibular, com duração de dois meses, e observaram que, após a intervenção, três, dos quatro sujeitos, aumentaram seus escores na Escala de Berg enquanto o quarto indivíduo manteve a pontuação inicial. Nesta mesma perspectiva, os resultados de um estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2008) em dez sujeitos com EM, demonstraram melhora significativa no escores da escala de Berg após um período de intervenção de 15 sessões de um programa terapêutico, que compreendia treino de equilíbrio em bola suíça, cama-elástica, prancha de desequilíbrio e treino de marcha na barra paralela, circuitos, rampas e escadas.

Ao revisar os resultados de diversos estudos, que se dedicaram a avaliar diferentes exercícios terapêuticos em portadores de EM, Giesser (2007) sugere, que o aprimoramento das estratégias de intervenção, parece ser necessário para efetivação de técnicas terapêuticas empregadas na reabilitação de indivíduos com EM. Nessa perspectiva, Cattaneo *et al.* (2007) analisaram os efeitos de estratégias sensoriais na reabilitação do equilíbrio postural de um grupo de pessoas com EM e

constatarem, que exercícios, que utilizam estratégias sensoriais surtiram melhores resultados no equilíbrio postural do que exercícios aeróbicos e resistidos.

2.7 A Equoterapia como método de intervenção

O termo equoterapia origina-se da palavra grega *hippos* - cavalo, e designa o tratamento realizado com o cavalo. Os efeitos terapêuticos da prática equestre tem sido descritos desde a época de Hipócrates (458-370 a.C.), que indicava a equitação como forma de regenerar a saúde. Entretanto, somente a partir de 1960 as qualidades terapêuticas da equitação foram reconhecidas, principalmente em países europeus (TOIGO, 2008). Nesse período, surgiram experiências, que nortearam cientificamente essa atividade, dando origem a uma especialidade que viria a ser designada como Hipoterapia. Esse modelo influenciou, de forma determinante, a atual concepção brasileira de equoterapia.

A Equoterapia pode ser definida como um conjunto de técnicas reeducativas e/ou reabilitativas, que atuam para superar danos sensoriais, cognitivos e comportamentais desenvolvendo atividades lúdico-esportivas por intermédio do cavalo (ANDE-Brasil, 2010).

A utilização desse método terapêutico tem se tornado cada vez mais presente e despertado o interesse de muitos estudiosos. As pesquisas descrevem a sistematização do método e avaliações dos resultados frente a inúmeras síndromes, deficiências e comprometimentos neuromotores, assim como, nos planos psicossocial e educacional. Esses trabalhos tem alcançado bons resultados e evidenciado a validade da equoterapia, enquanto recurso terapêutico complementar, além de aperfeiçoar sua aplicação e técnica.

Os principais benefícios observados após a inserção de programas de equoterapia apontam para redução dos déficits de equilíbrio corporal e melhor adequação da estabilidade postural (BIERY, KAUFFMAN, 1989; KUCZYNSKI, SLONKA, 1999; HAMMER *et al.*, 2005; HAMILL *et al.*, 2007; SILKWOOD-SHERER, WARMBIER, 2007), estabilidade de cabeça e tronco (SHURTLEFF; ENGSBERG, 2010; SHURTLEFF *et al.*, 2009), reações de correção postural (BERTOTI, 1988) e diminuição dos indicadores de comprometimentos de marcha (HAEHL *et al.*, 1999;

WINCHESTER *et al.*, 2002; COPETTI *et al.*, 2007; MCGEE, REESE, 2009). Regulação de tônus muscular e reeducação dos mecanismos de reflexos posturais (BENDA *et al.*, 2003; LECHNER *et al.*, 2007), bem como melhorias nas funções motoras grosseiras (STERBA *et al.*, 2002; WINCHESTER *et al.*, 2002; CHERNG *et al.*, 2004) também tem sido destacadas.

A utilização do cavalo, como instrumento terapêutico propicia um movimento que é tridimensional, variável, rítmico e repetitivo (DIAS, MEDEIROS, 2002). Esse movimento é transmitido ao cérebro do praticante pelas inúmeras terminações nervosas aferentes. O cérebro, por sua vez, manda informações ao corpo para que novos ajustes motores sejam realizados por meio do comportamento adaptativo, que é resultante também dos estímulos sensoriais (DIAS, MEDEIROS, 2002). A variedade de movimentos disponíveis pelo cavalo favorece ao terapeuta a graduação na quantidade de informações sensoriais a serem enviadas ao praticante, associadamente a outras técnicas terapêuticas para chegar a um objetivo comum. Esta manipulação assume a forma de alterações na velocidade, direção, cadência e a troca de superfície (areia, asfalto, grama).

Segundo Machado (2003), os neurônios aumentam ou diminuem sua atividade, de acordo com a excitação ou inibição de impulsos elétricos com outros neurônios a eles conectados. Conforme o tipo de informação recebida por um neurônio, ele se "especializará" naquele tipo de informação, produzindo um determinado neurotransmissor, o qual vai reagir de determinada forma para aquele estímulo. Desta forma, o cérebro se molda de acordo com o padrão formado pelas redes de neurônios e é capaz de juntar, sempre que necessário, os fragmentos de informações em uma imagem mental, a qual podemos identificar (Machado 2003). Sendo assim acredita-se que a intervenção com Equoterapia pode ser eficaz em indivíduos com disfunções neurológicas por atuar diretamente na plasticidade neuronal.

3 METODOLOGIA

3.1 Delineamento

Este estudo contemplou a utilização de dois delineamentos distintos, a fim de satisfazer os objetivos propostos. O caráter quase-experimental foi utilizado para verificar o efeito de um período de intervenção, através da Equoterapia sobre o controle postural de portadores de EM e o delineamento tipo caso-controle foi adotado para descrever os índices de dano ao DNA de portadores de EM comparados a controles saudáveis (COZBY, 2003; THOMAS; NELSON, 2002).

3.2 Grupo de Estudos

O grupo de estudo foi composto por 14 portadores de Esclerose Múltipla escolhidos intencionalmente de acordo com os critérios de inclusão previamente definidos. Da mesma forma, foram incluídos 28 sujeitos saudáveis para compor um grupo controle.

Em ambos os grupos a adesão foi voluntária, os sujeitos mostraram-se capazes de responder ativamente a uma anamnese, tinham idades compreendidas pela faixa etária de 20 a 60 anos, sexos masculino ou feminino, e não possuíam histórico de tabagismo. Além disso, para os sujeitos com EM foi solicitado diagnóstico neurológico, capacidade de permanecer em pé, sem utilizar equipamento de apoio, por pelo menos um minuto, competência de andar (com ou sem dispositivos de auxílio) e liberação médica para a prática de equoterapia.

3.3 Procedimentos

Este estudo acompanha as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado conforme parecer nº. 23081.009954/2009-77.

Após triagem inicial, os sujeitos foram esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos metodológicos, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Para elucidar variáveis que poderiam intervir nas análises, foi conduzida uma anamnese que investigou o histórico clínico dos sujeitos.

3.4 Avaliação dos índices de dano ao DNA

A detecção de danos do DNA foi feita através da versão alcalina do ensaio cometa, realizada conforme descrito por Singh et al. (1988) em acordo com as diretrizes gerais para uso do ensaio cometa (COLLINS *et al.*, 1995; ROSS *et al.*, 1995; TICE *et al.*, 2000; HARTMANN *et al.*, 2003).

Para condução deste ensaio foi coletado, de cada sujeito, uma amostra de 5 ml de sangue periférico, por punção venosa, em seringas plásticas descartáveis. As amostras foram transferidas para tubos heparinizados, armazenadas no escuro e protegidas de calor. O tempo entre coleta e início do processamento das amostras não excedeu 4 horas. Após a lise das células sanguíneas os leucócitos foram isolados e o ensaio cometa foi conduzido.

As amostras foram processadas em duplicatas. Em cada lâmina, 100 células foram escolhidas aleatoriamente, e analisadas em microscópio óptico binocular, com magnificação de 400 vezes. A classificação visual dos aspectos morfológicos das células, em cinco categorias (0 - 4) sugeridas por Collins et al. (1995) foi baseada na migração dos fragmentos do DNA nuclear e pode ser visualizada na Figura 2.

Na categoria 0 foram incluídas as células com núcleo esférico e sem cauda aparente (células não danificadas), células com cabeça pequena, cauda longa e difusa foram incluídos na categoria 4. As demais células foram classificadas conforme características intermediárias. Assim, dado o número de células em cada categoria, foi calculado o Índice de Dano ao DNA (ID) pela expressão:

$$ID = \frac{(0xC0 + 1xC1 + 2xC2 + 3xC3 + 4xC4)}{(\Sigma/100)}$$

Onde, ID é o índice de dano ao DNA em unidade arbitrária (ua) e C0, C1, C2, C3 e C4 são o número de células nas classificadas nas categorias 0, 1, 2, 3 e 4,

respectivamente e, Σ é a soma de todas as células contadas (100). Assim, o ID pode variar de zero (ausência de dano) a 400 (todas as células com dano máximo).

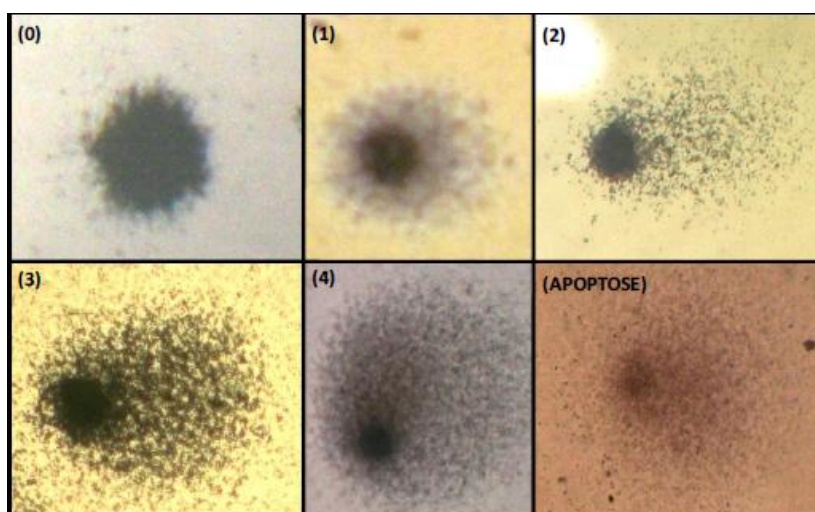


Figura 2 – Classificação do Dano ao DNA dos indivíduos analisados. Quanto maior o nível de dano maior o número a ele atribuído. Classe 0 representa células sem dano e classe 4 o mais alto dano.

As lâminas foram analisadas por dois avaliadores, em condições de cego. Para comparação entre os grupos foi utilizado o ID médio de cada sujeito calculado a partir do ID observado em cada réplica.

3.5 Avaliação do Controle Postural

A avaliação do controle postural, realizada somente no grupo com Esclerose Múltipla, foi feita através da estabilometria, com registro de dados cinéticos relativos ao Centro de Pressão (COP) dos indivíduos em postura estática, posicionados sobre uma plataforma de força OR6-7 AMTI (*Advanced Mechanical Technologies, Inc.*) (Figura 3), a uma frequência de amostragem de 100 Hz.

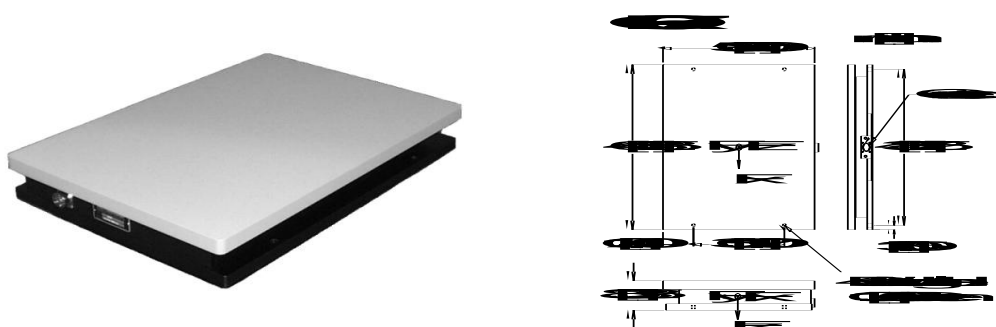


Figura 3 - Plataforma de força OR6-7 AMTI: dimensões e sistemas de referência.
Fonte: Advanced Mechanical Technologies, Inc.

Durante a aquisição dos dados, os sujeitos permaneceram descalços, em apoio bípede. Um alvo fixo foi disposto na altura dos olhos e afastado 1 m para referência visual. Cada sujeito realizou três tentativas de 30 segundos. Os dados extraídos do sistema processados através de rotinas desenvolvidas no Software Matlab 7.3 (*Matrix Laboratory - Mathworks Inc., EUA*).

3.6 Intervenção através da Equoterapia

O programa de estimulação foi proposto somente para os sujeitos portadores de EM e contou basicamente com exercícios de adaptação à postura de montaria, alongamentos, técnicas específicas de equitação e exercícios pré-esportivos como mudanças de direção para estimular a dissociação de cinturas pélvica e escapular; variações de piso, cadência (areia, asfalto e gramado) e terreno (plano, acidentado e inclinado) objetivando intensificar os movimentos de ântero e retroversão pélvica, e elevações no estribo para fortalecimento da musculatura dos membros inferiores. As atividades foram oportunizadas a todos os sujeitos e o nível de dificuldade das tarefas aumentado gradativamente.

As sessões de estimulação, através da equoterapia, realizaram-se duas vezes por semana, durante um período de quatro meses, e tiveram duração média de 50 minutos cada, sendo desses, 30 minutos ininterruptos com o cavalo andando ao passo. As atividades foram conduzidas em duplas e assistidas por profissionais capacitados. Os cavalos estiveram equipados com estribos, rédeas e manta para montaria, enquanto os sujeitos praticantes usaram capacete para proteção.

4 RESULTADOS

As sessões de resultados, discussão dos resultados e conclusões deste estudo serão divididos sob a forma de dois manuscritos apresentados a seguir:

4.1 Artigo de Pesquisa I - Dano ao DNA e controle postural de portadores de Esclerose Múltipla

Resumo

Objetivo: Esse estudo se propôs a avaliar os índices de dano ao DNA de portadores de Esclerose Múltipla (EM) em comparação com controles saudáveis, e verificar se existe relação entre os índices de danos ao DNA e parâmetros do controle postural. Um estudo caso-controle foi conduzido, onde incluímos 42 indivíduos dos sexos masculino ou feminino. Os voluntários foram divididos em dois grupos, pacientes EM (n=14, 40,7±8,3 anos) e grupo controle (28 indivíduos saudáveis, 35,10±15,3 anos). Os índices de dano ao DNA foram avaliados através do ensaio cometa alcalino e os parâmetros do controle postural mensurados através da estabilometria. Resultados: Pacientes com EM apresentaram maiores índices de dano de DNA (21,3±4,8) do que controle saudáveis (7,9±6,1), com p=0,0001. Esta associação foi independente de sexo e idade. Não foram encontradas associações entre os índices de dano ao DNA e os parâmetros do controle postural. **Conclusão:** os resultados encontrados nesse estudo se somam a estudos congêneres que observaram maior índice de dano ao DNA de portadores de EM quando comparados a controles saudáveis.

Palavras-chaves: Dano ao DNA; Esclerose Múltipla; Ensaio Cometa; Controle Postural;

Abstract

Purpose: This study examined the rates of DNA damage in Multiple Sclerosis (MS) patients compared with healthy controls, and to investigate the relationship between the rates of DNA damage and parameters of postural control. **Methods:** A case-control study was conducted, where we selected 42 individuals between males and females. The volunteers were divided into two groups, MS patients (n=14, 40.7 ± 8.3 years), control group (28 health individuals, 35.10 ± 15.3 years). The DNA damage index was analyzed by alkaline comet assay. The postural control parameters was measured by stabilometry. **Results:** Patients with MS showed higher DNA damage rates (21.3 ± 4.8) than control group (7.9 ± 6.1), p=0.001. This association was independent of sex and age. No association was found between DNA damage index and postural control parameters. **Conclusion:** The results of this study are in addition to similar studies that observed higher rate of DNA damage in MS patients compared to healthy controls.

Keywords: DNA damage, multiple sclerosis; Comet assay; Postural Control

1. Introdução

Os eventos que constituem o desenvolvimento dos organismos envolvem tanto a participação genética quanto ambiental. Danos cumulativos causados ao material genético (DNA, ácido desoxirribonucléico), induzidos pelo aumento de moléculas de oxigênio desemparelhadas eletricamente (espécies de reativas de oxigênio, EROs), resultariam no declínio no desempenho fisiológico das células afetadas¹⁻³. O desequilíbrio no organismo em favor da geração excessiva de radicais livres, ou em detrimento da velocidade de remoção destas espécies, é conhecido

como estresse oxidativo e pode ser induzido por um grande número de agentes físicos e químicos do ambiente, bem como por compostos produzidos pelo metabolismo celular^{2,3}. Quando a produção de EROs oprime a capacidade antioxidante celular, a incidência de estresse oxidativo pode resultar em danos a macromoléculas, como lipídeos, proteínas, e nucleotídeos^{2,4-6}.

Alguns estudos apontam que a percepção ou ausência de dano ao DNA *in vivo*, torna-se eficaz na avaliação de disfunções neurológicas^{1,2,5}, pois permite que seja observada a influência de agentes mutagênicos (genotoxicidade). Nessa perspectiva, o ensaio cometa (Single Cell Gel Electrophoresis), sendo um método sensível para mensurar quebras de cadeia simples e/ou duplas, pode ser utilizado como marcador de dano oxidativo no DNA^{7,8}.

Estudos atuais sugerem que a incidência de estresse oxidativo possa estar associado ao envelhecimento precoce e a doenças cardiovasculares e neurodegenerativas^{5,6,9,10}. Dentre eles, alguns evidenciam que espécies reativas de oxigênio (EROs) podem contribuir para vários mecanismos subjacentes às lesões da Esclerose Múltipla (EM)^{6,9}.

A EM é uma neuropatologia crônica caracterizada pela infiltração de células inflamatórias no Sistema Nervoso Central (SNC)¹¹. Os fatores que influenciam o surgimento dessa patologia ainda não foram elucidados, contudo a hipótese patogênica mais aceita é que a EM seja fruto de uma predisposição genética associada a um fator ambiental desconhecido que, ao se encontrarem desencadeiam uma disfunção no sistema imune, incluindo a desmielinização, dano axonal e perda de oligodendrócitos^{4,6,9,11}.

Em reflexo dos diferentes mecanismos responsáveis pela destruição da mielina, a EM geralmente tem caráter heterogêneo e tende a evoluir através de episódios de surto-remissão resultando em formas clínicas distintas, conforme a localização das lesões¹¹. Essas lesões provocam uma gama de sinais neurológicos que podem comprometer os mecanismos controle postural¹²⁻¹⁴.

Considerando as evidências de que espécies reativas de oxigênio (EROs) podem contribuir para mecanismos subjacentes às lesões da EM e as frequentes observações de comprometimento no controle postural de portadores de EM esse estudo se propôs a avaliar os índices de dano ao DNA de portadores de EM, através do Ensaio Cometa, e comparar os índices de danos ao DNA com os parâmetros do controle postural.

2. Método

2.1 Sujeitos

Foram incluídos neste estudo 42 indivíduos, de ambos os sexos, escolhidos intencionalmente e divididos em dois grupos: Grupo com Esclerose Múltipla (EM) (n 14) e Grupo Controle (n 28).

Em ambos os grupos a adesão foi voluntária, os sujeitos mostraram-se capazes de responder ativamente a uma anamnese, tinham idades compreendidas pela faixa etária de 20 a 60 anos e não possuíam histórico de tabagismo. As características gerais dos sujeitos compreendidos por ambos os grupos podem ser visualizadas na Tabela I.

Tabela I – Caracterização dos sujeitos		
	EM	Controle
N	14	28
Mulheres	10	16
Homens	4	12
Idades*	40,71±8,27	35,11±15,26
Duração da EM*	7,28±7,41	-

*anos: média e desvio padrão

2.2 Procedimentos

Este estudo acompanha as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado conforme parecer nº. 23081.009954/2009-77.

Após triagem inicial, os sujeitos foram esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos metodológicos, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Para elucidar variáveis que poderiam intervir nas análises, foi conduzida uma anamnese que investigou o histórico clínico dos sujeitos.

2.3 Avaliação dos Índices de dano ao DNA

A detecção de danos do DNA foi feita através da versão alcalina do ensaio cometa, realizada conforme descrito por Singh *et al.*⁷ em acordo com as diretrizes gerais para uso do ensaio cometa^{8,15,16}.

Para condução deste ensaio foi coletado, de cada sujeito, uma amostra de 5 ml de sangue periférico, por punção venosa, em seringas plásticas descartáveis. As amostras foram transferidas para tubos heparinizados, armazenadas no escuro e protegidas de calor. O tempo entre coleta e início do processamento das amostras não excedeu 4 horas. Após a lise das células sanguíneas os leucócitos foram isolados e o ensaio cometa foi conduzido.

As amostras foram processadas em duplicatas. As imagens de 100 células, escolhidas aleatoriamente, em cada lâmina, foram analisadas em microscópio óptico binocular, com magnificação de 400 vezes. A classificação visual dos aspectos morfológicos das células, em cinco categorias (0 - 4) sugeridas por Collins *et al.*¹⁵, foi baseada na migração dos fragmentos do DNA nuclear. Na categoria 0 foram incluídas as células com núcleo esférico e sem cauda aparente (células não danificadas), células com cabeça pequena, cauda longa e difusa foram incluídos na categoria 4. As demais células foram classificadas conforme características intermediárias. Assim, dado o número de células em cada categoria, foi calculado o Índice de Dano ao DNA (ID) pela expressão:

$$ID = \frac{(0xC0 + 1xC1 + 2xC2 + 3xC3 + 4xC4)}{(\Sigma/100)}$$

Onde, ID é o índice de dano ao DNA em unidade arbitrária (ua) e C0, C1, C2, C3 e C4 são o número de células nas classificadas nas categorias 0, 1, 2, 3 e 4, respectivamente e, Σ é a soma de todos as células contadas (100). Assim, o ID pode variar de zero (ausência de dano) a 400 (todas as células com dano máximo).

As lâminas foram analisadas por dois avaliadores, em condições de cego. Para comparação entre os grupos foi utilizado o ID médio de cada sujeito calculado a partir do ID observado em cada réplica.

2.4 Avaliação do Controle Postural

A avaliação do controle postural, realizada somente no grupo com Esclerose Múltipla (EM), foi feita através da estabilometria, utilizando-se o registro do deslocamento Centro de Pressão (COP) dos indivíduos em postura estática,

posicionados sobre uma plataforma de força OR6-7 AMTI (*Advanced Mechanical Technologies, Inc.*), a uma frequência de amostragem de 100 Hz.

Durante a aquisição dos dados, os sujeitos permaneceram descalços, em apoio bípede, com os pés afastados à largura do quadril. Um alvo fixo foi disposto na altura dos olhos e afastado 1 m para referência visual. Cada sujeito realizou três tentativas de 30 segundos. Os dados extraídos do sistema processados através de rotinas desenvolvidas no Software Matlab 7.3 (*Matrix Laboratory - Mathworks Inc., EUA*).

Foram consideradas para análise as seguintes variáveis derivadas do COP: 1) amplitude de deslocamento ântero-posterior (AMPap) - distância entre o deslocamento máximo e mínimo do COP na direção ântero-posterior; 2) amplitude de deslocamento médio-lateral (AMPml) - distância entre o deslocamento máximo e mínimo do COP na direção médio-lateral; 3) Velocidade Média Total (VMT) - calculada pela trajetória dos deslocamentos do COP nas duas direções dividida pelo tempo total da tentativa.

2.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas no pacote estatístico SPSS, versão 17.0. Os dados foram comparados entre os dois grupos (EM e controle) com teste t de student para as variáveis contínuas e testes qui-quadrado e teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas. Em todas as comparações o nível de significância foi estabelecido em 95%.

3. Resultados

Um total de 42 indivíduos foram incluídos no estudo, sendo 14 afetados pela Esclerose Múltipla e 28 saudáveis. A idade média em ambos os grupos foi estatisticamente similar ($p=0,208$). No caso, sujeitos com EM tinham $40,7\pm 8,3$ anos e sujeitos saudáveis tinham $35,10\pm 15,3$ anos. O grupo EM apresentou número maior de mulheres na proporção de 2,5:1. Enquanto no grupo controle não houveram diferenças entre sexo.

A anamnese revelou que todos os sujeitos com EM estavam recebendo terapia imunossupressora corrente e participavam de sessões semanais de fisioterapia.

O índice de dano de DNA (ID), obtido através do ensaio cometa, foi comparado entre ambos os grupos e pode ser visualizado na Figura 1.

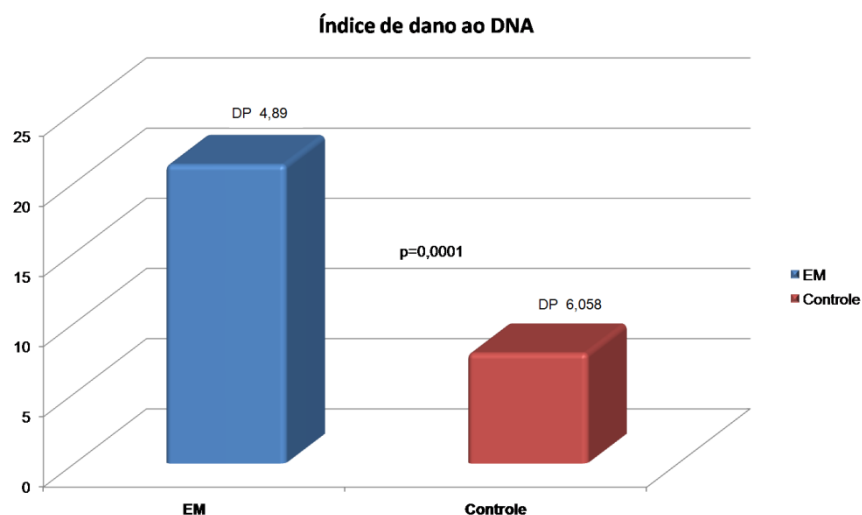


Figura 1 – Comparação do índice de dano ao DNA entre o grupo com Esclerose Múltipla e Grupo Controle: p - teste t de Student; DP – Desvio Padrão.

Os resultados indicam que os portadores de EM apresentaram maior ID ($21,3 \pm 4,8$) do que o grupo controle ($7,9 \pm 6,1$) com $p=0,0001$. Esta associação foi independente de sexo e idade.

Uma análise adicional foi feita a partir da recategorização dos sujeitos do grupo EM conforme o ID. Não foi encontrada padronização de corte quanto aos ID em sujeitos com EM. Assim, de acordo com a aproximação do ID médio observado no grupo EM, utilizou-se $ID \geq 20$ e $ID < 20$ para divisão. O ID de ambos os subgrupos foram comparados com a idade, o tempo de diagnóstico de EM e parâmetros do controle postural. Os resultados dessas comparações podem ser visualizados na Tabela II.

Tabela II: Comparação entre subgrupos de Esclerose Múltipla categorizados quando Índice de dano ao DNA

Variáveis	ID	n	Média	DP	p
Idade	≥20	9	38,44	8,79	0,195
	<20	5	44,80	7,46	
TD	≥20	9	6,88	5,68	0,807
	<20	5	8,00	11,24	
AMPap*	≥20	9	2,34	0,93	0,746
	<20	5	2,51	0,84	
AMPml*	≥20	9	1,70	1,09	0,650
	<20	5	1,99	1,11	
VMT*	≥20	9	1,45	1,02	0,695
	<20	5	1,66	0,81	

Idade (anos); TD - tempo de diagnóstico (anos); *Parâmetros do controle postural: AMPap - amplitude de deslocamento ântero-posterior (cm), AMPml - amplitude de deslocamento médio-lateral (cm), VMT - velocidade média total (cm/s); ID - Índice de dano ao DNA (ua); DP - desvio padrão.

Conforme descrito na Tabela II, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos de EM dentro das variáveis investigadas.

4. Discussão dos resultados

Esse estudo se propôs a verificar os índices de dano ao DNA em sujeitos com EM comparados a controle saudáveis e observar se, em portadores de EM, variáveis adjacentes como idade, sexo, tempo de progressão da doença e parâmetros do controle postural estão associadas aos índices de dano ao DNA. Os resultados indicam que, independente da idade e sexo, portadores de EM apresentam índices de dano ao DNA maiores do que controles saudáveis. Quando considerado somente o grupo com EM não encontramos associação entre os índices de dano ao DNA e as demais variáveis consideradas na análise.

Os danos ao DNA podem ser induzidos por um grande número de agentes físicos e químicos do ambiente, bem como por compostos produzidos pelo metabolismo celular^{2,3}. Muitas evidências tem sugerido que os danos ao DNA, resultantes do acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs), muitas vezes designadas como radicais livres, contribuam para diversas condições

clínicas^{1,3}. Embora ainda não seja elucidado como o estresse oxidativo influencia na etiologia de doenças neurodegenerativas, alguns estudos tem sugerido que o aumento na produção de EROs tem envolvimento na patogênese de doenças como Parkinson e Alzheimer^{5,17-19}.

Em portadores de Esclerose Múltipla, pouco se sabe sobre os tipos de células afetadas pelas EROs. No entanto, em comparação com controles saudáveis, estudos tem demonstrado aumento da atividade das EROs e/ou deficiências em importantes enzimas antioxidantes¹⁰.

Alguns estudos tem evidenciado que as EROs podem contribuir para vários mecanismos subjacentes às lesões da EM^{4,6,9}. Esses ensaios sugerem que as EROs, produzidas na interação de monócitos no endotélio cerebral, desencadeiam alterações do citoesqueleto, perda da integridade da barreira hemato-encefálica, e posterior extravasamento de leucócitos para o Sistema Nervoso Central (SNC)⁶. Além disso, os leucócitos infiltrados podem produzir grandes quantidades de EROs, que induzem a fagocitose de mielina e desagregação por macrófagos^{4,9,11}, o dano oligodendroglial⁶ e lesão neuronal e axonal^{9,11}. Em conjunto, essas implicações desencadeiam uma série de sintomas e sinais neurológicos característicos da EM que comprometem as atividades funcionais dos sujeitos acometidos por essa patogenese.

Dentre as disfunções observadas em portadores de EM, as alterações nos mecanismos do controle postural são manifestações frequentes¹²⁻¹⁴. Considerando que o controle postural é o resultado de complexas interações entre os sistemas músculo-esquelético e neuromusculares, incluindo componentes sensoriais como a visão e os sistemas proprioceptivo e vestibular²⁰ e, ponderando que na EM ainda não se conhece a extensão de células que podem ser afetadas pelas EROs^{10,19} neste estudo, tentamos estabelecer uma relação entre parâmetros do controle postural e os índices de dano ao DNA observados nos sujeitos com EM. Nossas análises não encontraram associação entre as variáveis investigadas. Em contrapartida, não foram encontrados estudos similares que permitissem a discussão mais aprofundada dos resultados encontrados.

5. Conclusões

Os resultados encontrados nesse estudo se somam a estudos congêneres que observaram maior índice de dano ao DNA de portadores de EM quando comparados a controles saudáveis.

Mesmo com o crescente avanço no entendimento das mais distintas expressões da EM, no que tange ao controle postural, há necessidade de estabelecer a relação dos mecanismos predominantes nas estratégias de controle postural, bem como quais os sistemas são mais afetados.

6. Referências

1. COOKE, M. S. *et al.* Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **Faseb Journal** 17(10): 1195-1214, 2003.
2. EVANS, M. D. *et al.* Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research** 567(1): 1-61, 2004.
3. D'ERRICO, M. *et al.* Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research** 659(1-2): 4-14, 2008.
4. VAN DER GOES, A. *et al.* Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. **Journal of Neuroimmunology** 92(1-2): 67-75, 1998.
5. KADLOGLU, E.S. *et al.* Detection of oxidative DAN damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. **Biomarkers** 9(2): 203-209, 2004.
6. VAN HORSSSEN, J. *et al.* Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. **Free Radical Biology and Medicine** 45(12): 1729-1737, 2008.
7. SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175: 184-191, 1988.
8. ROSS, G.M.; MCMILLAN, T.J. WILCOX, P.; COLLINS, A.R. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. **Mutation Research** 337: 57-60, 1995.

9. GILGUN-SHERKI, Y. *et al.* The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. **Journal of Neurology** 251(3): 261-268, 2004.
10. VAN HORSSSEN, J. *et al.* Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. **Biochim Biophys Acta**. xx(xxx-xxx), 2010.
11. KORNECK, B. LASSAMANN, H. Neuropathology of multiple sclerosis - new concepts. **Brain Research Bulletin** 61(3): 321-326, 2003.
12. MARTIN, C.L. *et al.* Gait and balance parameters as clinical markers of disease progression in early multiple sclerosis. **18th Meeting of the European Neurological Society**, 2008.
13. VAN EMMERIK, R.E.R. *et al.* Postural control in women with multiple sclerosis: Effects of task, vision and symptomatic fatigue. **Gait & Posture** xx: xxx-xxx, 2010.
14. POROSIŃSKA, A. P. *et al.* Evaluation of postural balance control in patients with multiple sclerosis – effect of different sensory conditions and arithmetic task execution. A pilot stud. **Neurologia i Neurochirurgia Polska** 44(1): 35–42, 2010.
15. COLLINS A, *et al.* The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutat Res-DNA Repair** 336(1):69-77, 1995.
16. HARTMANN, A. *et al.* Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis** 18 (1): 45–51, 2003.
17. RAO, K. S. Free Radical Induced Oxidative damage to DNA: Relation to Brain Aging and Neurological Disorders. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics** 46(1): 9-15, 2009.
18. REDDY, V. P. *et al.* Oxidative Stress in Diabetes and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimers Disease** 16(4): 763-774, 2009.
19. LEVINE, S.M. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Med Hypotheses*. 39:271-4, 1992.
20. SHUMWAY-COOK A, WOOLLACOTT MH. **Controle Motor: Teoria e Aplicações Práticas**, 2ª ed. São Paulo: Manole, 2003.

4.2 Artigo de Pesquisa II - Controle postural de portadores de Esclerose Múltipla submetidos à Equoterapia

Resumo

Introdução: A Esclerose Múltipla (EM) é uma neuropatologia crônica caracterizada pela infiltração de células inflamatórias no Sistema Nervoso Central (SNC). Os comprometimentos desencadeados pela EM são variados e dependem da região afetada, no entanto, alterações no controle postural são achados comuns em portadores de EM. **Objetivo:** Este estudo se propôs a verificar se a estimulação através da equoterapia é capaz de desencadear alterações no controle postural de portadores de EM. **Método:** Fizeram parte deste estudo 14 portadores de EM, divididos intencionalmente, conforme relato de instabilidade corporal, em Grupo Intervenção (GI) idade média de $44 \pm 9,09$ anos e Grupo Comparação (GC) com idade média de $47,25 \pm 5,31$ anos. O controle postural foi avaliado através da estabilometria, durante 30 segundos, em postura quieta. Durante as avaliações a informação visual foi manipulada. **Intervenção:** As sessões de estimulação, através da equoterapia, foram conduzidas duas vezes por semana, durante quatro meses, com duração média de 50 minutos cada. Após o período destinado a intervenção todos os sujeitos foram reavaliados. **Resultados:** Após a estimulação os sujeitos do GI foram capazes de reduzir os valores de todas as variáveis analisadas, com maior ênfase de redução na amplitude de oscilação ântero-posterior, enquanto o GC manteve um comportamento inalterado entre as avaliações. Em ambos os grupos o desempenho foi piorado quando a informação visual foi suprimida. **Conclusões:** Após um período de quatro meses de estimulação, a estimulação proporcionada pela equoterapia foi capaz de desencadear alterações favoráveis no controle postural de portadores de EM, podendo ser indicada como uma prática terapêutica eficiente para esta população.

Palavras-chave: Equilíbrio Corporal; Equoterapia; Exercício terapêutico; Esclerose Múltipla;

Abstract

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic neuropathology characterized by infiltration of inflammatory cells in the central nervous system (CNS). The impairments caused by the MS are varied and depend on the affected region, however, changes in postural control are common findings in MS patients. **Purpose:** To determine whether stimulation through hippotherapy can change the postural control in people with MS. **Methods:** The study from 14 MS patients, divided intentionally, according to report of body instability in Intervention Group (IG), mean age 44 ± 9.09 years and Comparison Group (CG) with a mean age of 47.25 ± 5.31 years. The postural control was assessed by stabilometry for 30 seconds in quiet stance. During the evaluations, the visual information was manipulated. **Intervention:** The stimulation sessions through hippotherapy, were conducted twice a week for four months, with an average duration of 50 minutes each. After the intervention period for all subjects were reassessed. **Results:** After the stimulation of IG subjects were able to reduce the values of all variables, with greater emphasis on reducing the amplitude of oscillation anteroposterior, while CG remained unchanged between the behavior ratings. In both groups, performance was worse when visual information was suppressed. **Conclusions:** After a period of four months of stimulation, the stimulation offered by hippotherapy was able to initiate changes in postural control in favor of MS patients can be recommended as an effective therapy practice for this population.

Key-words: **Body Balance; Hippotherapy; Exercise Therapy; Multiple Sclerosis**

Introdução

A Esclerose Múltipla é uma neuropatologia crônica caracterizada pela infiltração de células inflamatórias no Sistema Nervoso Central (SNC)^{1,2}. Os fatores que influenciam o surgimento dessa disfunção ainda não foram claramente definidos. No entanto, acredita-se que a EM seja mediada por uma reação auto-

imune desencadeada pela predisposição genética associada a um fator ambiental desconhecido que resulta em lesões focais à mielina. Essa disfunção pode dificultar e interromper a transmissão de impulsos nervosos ou acarretar falha na propagação de potenciais de ação axonais³. O caráter progressivo, a variabilidade da localização, o volume das lesões e a seqüência de surgimento podem desencadear inúmeros sinais e sintomas clínicos que comprometem as atividades funcionais³.

Estudos epidemiológicos tem admitido que a EM geralmente surja no início da idade adulta e seja, atualmente, a causa mais comum de incapacidade física adquirida em muitos países da América do Norte e Europa^{4,5}. A incidência da EM é maior nos países de clima temperado e fresco do que nos países de clima quente¹. No Brasil, devido a grande variabilidade climática, a distribuição e a caracterização clínica da EM ainda não foram estabelecidas. Recentes estudos revelaram taxas de 15 casos/100.000 habitantes, nas regiões sul e sudeste^{5,6}.

As manifestações clínicas da EM são variáveis e o curso da doença não é linear, caracterizado por sintomas e sinais difíceis de quantificar. No entanto, a alteração dos mecanismos de controle postural e conseqüente aumento na taxa de quedas são observações frequentes em indivíduos acometidos pela EM⁷⁻¹².

O controle postural é o resultado de complexas interações entre os sistemas músculo-esqueléticas e neuromusculares, incluindo componentes sensoriais como a visão, os sistemas proprioceptivo e vestibular¹³. O nível de controle aportado por cada sistema, em diferentes situações, ainda não foi estabelecido. No entanto, sabe-se que o comprometimento de qualquer componente desses sistemas pode resultar em diminuição do controle postural.

Estudos atuais tem discutido o processo de controle postural e assim, tentam observar quais os mecanismos de controle predominantes em diferentes situações e/ou quais estão mais suscetíveis a comprometimentos desencadeados pelas mais diversas disfunções neurológicas. Há evidências de que indivíduos saudáveis, para manter a postura quieta, num ambiente bem iluminado, com uma superfície estável, confiam aproximadamente 70% em informações provenientes do sistema somatosensorial, 20% em informações vestibulares e 10% nas informações visuais¹⁴. Em indivíduos com EM observou-se que o sistema visual pode ser perturbado por placas no nervo óptico levando à cegueira, visão turva ou diplopia¹⁵, o envolvimento das vias vestibulares pode ser associado com vertigens e

nistagmos¹⁶ e, além disso, distúrbios de propriocepção, espasticidade e fraqueza muscular^{4,9,17,18}, também foram observados.

Em resposta ao comprometimento de vários sistemas, os indivíduos com EM apresentam uma distorção na integração sensorial e evidenciam deteriorações funcionais, mesmo na ausência de recidiva clínica¹⁰. Pesquisas apontam que a avaliação dos diferentes aspectos do controle postural e a determinação dos fatores que contribuem para as quedas podem ser utilizados como marcador da progressão da EM, além de orientar a utilização de estimulações eficazes para redução dos déficits e prevenção de quedas^{7-10,12}.

Estudos indicam que intervenções terapêuticas tenham potencial para melhorar muitas das deficiências observadas na EM^{4,17,19}. Algumas abordagens como a fisioterapia convencional e exercícios físicos, entre outras técnicas de reabilitação, tem sido utilizadas com intuito de manter a independência física. No entanto, a efetividade dessas intervenções nem sempre é comprovada em aspectos funcionais. O aprimoramento das estratégias de intervenção parece ser necessário para otimizar os resultados e, nessa perspectiva, evidencia-se que a utilização de estratégias sensoriais deve ser parte integrante do programa de reabilitação para indivíduos com EM¹⁹. Nesse contexto, as atividades de estimulação equestre, no Brasil inseridas na Equoterapia²⁰ podem ser consideradas como abordagem multissistêmica para o tratamento de doenças neurológicas^{21,22}, pois solicita reações posturais, combinadas a dissociação das cinturas pélvica e escapular e constantes ajustes tônicos. Além de aumentar a demanda de informações sensoriais enviadas ao sistema vestibular e diversificar em quantidade e magnitude as informações visuais^{21,22}.

Nas últimas décadas, a efetividade da Equoterapia, enquanto método terapêutico, vem sendo descrita em uma série de condições neurológicas que desencadeiam comprometimento no controle postural e mobilidade²¹⁻²⁴. Recentemente, Lasa; Franchignoni²⁵ forneceram uma descrição da evolução dessa técnica nos últimos anos e sugeriram a necessidade de novos estudos sobre a eficácia dessa estimulação em populações específicas. Com esses pressupostos, este estudo se propôs a verificar se um período de estimulação, através da Equoterapia, é capaz de desencadear alterações no controle postural de portadores de Esclerose Múltipla.

Método

Grupo de Estudos

Os sujeitos deste estudo foram escolhidos intencionalmente, por conveniência, respeitando os seguintes critérios: 1) diagnóstico de EM, 2) faixa etária compreendida entre 20 e 60 anos, 3) capacidade de responder ativamente a questionário/anamnese, 4) capacidade de permanecer em pé, sem utilizar equipamento de apoio, por pelo menos um minuto, 5) competência de andar (com ou sem dispositivos de auxílio), 6) liberação médica para a prática de equoterapia, 7) ausência de prévio contato com atividades eqüestres, 8) curso estável da EM e, 9) adesão voluntária. Adotou-se ainda como critério de exclusão frequência inferior a 50% das sessões de estimulação.

Depois de esclarecidos os objetivos, procedimentos metodológicos, possíveis benefícios e/ou riscos do estudo, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os sujeitos que se adequaram aos critérios expostos (n=14), foram incluídos no estudo e divididos, intencionalmente, em dois grupos:

Grupo Intervenção (GI) - (n=9) composto por sujeitos, com relato de desequilíbrio corporal, submetidos a trinta sessões de equoterapia em um período de quatro meses.

Grupo de Comparação (GC) - (n=5) composto por sujeitos que não relataram queixa de desequilíbrio corporal e não receberam a estimulação.

Cabe salientar que as atividades de estimulação, propostas para o GI, foram incluídas no cotidiano dos sujeitos desse estudo como um método terapêutico complementar, à medida que estes já realizavam algum tipo de atividade terapêutica (conforme Tabela I). Foram excluídos do estudo os sujeitos (n=2) que não alcançaram frequência superior a 50% das sessões de estimulação, para o GI. No GC foi excluído 1 sujeito que não completou as testagens. As especificações dos grupos e a caracterização individual dos sujeitos podem ser observadas na Tabela I.

Tabela I: Caracterização dos Sujeitos

Grupo Intervenção (n= 7)						
ID	Sexo	Idade (anos)	MC (Kg)	Estatura (m)	TD (anos)	Atividades terapêuticas
1	F	51	75,1	1,7	3	**Fisioterapia **Equoterapia ⁺
2	F	58	57,6	1,43	28	**Fisioterapia **Equoterapia ⁺
3	M	40	101	1,7	6	**Equoterapia ⁺
4	F	35	49,5	1,65	14	*Yoga **Equoterapia ⁺
5	F	45	62	1,66	4	**Equoterapia ⁺
6	F	32	67,8	1,69	4	*Fisioterapia **Equoterapia ⁺
7	F	47	64	1,51	1	*Fisioterapia **Equoterapia ⁺
Grupo Comparação (n=4)						
8	M	43	75	1,81	1	**Pilates
9	M	43	120	1,78	6	**Natação
10	F	49	62	1,65	18	***Musculação
11	F	54	90,4	1,58	6	-

ID - identificação; MC - Massa Corporal; TD - Tempo de Diagnóstico de EM; *1 vez por semana; ** 2 vezes por semana; ***3 vezes por semana; ⁺Intervenção. **Nota:** De acordo com diagnóstico neurológico, os sujeitos não possuíam classificação definida quanto ao tipo de EM.

Procedimentos

Inicialmente foi conduzida uma anamnese, para verificar o histórico clínico da EM, acompanhada de uma avaliação antropométrica, que fez uso das medidas primárias de peso e estatura, para descrição de características individuais dos sujeitos.

O controle postural foi avaliado através da estabilometria, com registro das oscilações corporais, relativas ao Centro de Pressão (COP), dos indivíduos em postura estática, posicionados sobre uma plataforma de força OR6-7 AMTI (*Advanced Mechanical Technologies, Inc.*), a uma frequência de amostragem de 100 Hz.

Durante a aquisição dos dados, os sujeitos permaneceram descalços, em apoio bípede, com os pés afastados à largura do quadril. Um alvo fixo foi disposto na

altura dos olhos e afastado 1 m para referência visual. Determinou-se duas condições sensoriais:

Condição 1 - Olhos Abertos (OA), informação visual disponível,

Condição 2 - Olhos Fechados (OF), informação visual suprimida.

Cada sujeito realizou três tentativas de 30 segundos, para cada condição.

Após o período destinado a intervenção, os sujeitos foram reavaliados e os dados extraídos do sistema foram processados através de rotinas desenvolvidas no Software Matlab 7.3 (*Matrix Laboratory - Mathworks Inc., EUA*).

Foram consideradas para análise as seguintes variáveis derivadas do COP: 1) amplitude de deslocamento ântero-posterior (AMPap) - distância entre o deslocamento máximo e mínimo do COP na direção ântero-posterior; 2) amplitude de deslocamento médio-lateral (AMPml) - distância entre o deslocamento máximo e mínimo do COP na direção médio-lateral; 3) velocidade média do deslocamento ântero-posterior (VMap) e 4) velocidade média do deslocamento médio-lateral (VMml).

Os métodos e protocolos de intervenção empregados foram devidamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria e acompanham as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde sobre pesquisa envolvendo seres humanos, conforme parecer nº. 23081.009954/2009-77.

Intervenção através da Equoterapia

O programa de estimulação proposto contou basicamente com exercícios de adaptação à postura de montaria, alongamentos, técnicas específicas de equitação e exercícios pré-esportivos como mudanças de direção para estimular a dissociação de cinturas pélvica e escapular; variações de piso, cadência (areia, asfalto e gramado) e terreno (plano, acidentado e inclinado) objetivando intensificar os movimentos de ântero e retroversão pélvica, e elevações no estribo para fortalecimento da musculatura dos membros inferiores. As atividades foram oportunizadas a todos os sujeitos e o nível de dificuldade das tarefas aumentado gradativamente.

As sessões de estimulação, através da equoterapia, realizaram-se duas vezes por semana, durante um período de quatro meses, e tiveram duração média de 50 minutos cada, sendo desses, 30 minutos ininterruptos com o cavalo andando ao

passo. As atividades foram conduzidas em duplas e assistidas por profissionais capacitados. Os cavalos estiveram equipados com estribos, rédeas e manta para montaria, enquanto os sujeitos praticantes usaram capacete para proteção.

Tratamento Estatístico

Foi realizado mediante um delineamento inteiramente casualizado, com número variado de repetições, em um experimento fatorial 2^3 (2 grupos: GI e GC; 2 testes: pré e pós e; 2 condições sensoriais: OA e OF). Na metodologia utilizou-se análise de variância através do Teste F e *Post hoc* de Tukey. As variáveis foram transformadas, via raiz quadrada, para atingir a normalidade de distribuição. Todas as análises foram conduzidas no software SAS (Statistical Analysis System), versão 8.0, e a decisão estatística tomada com índice de significância de $p\text{-valor} < 0,05$.

Resultados

Os dados clínicos e demográficos dos sujeitos desse estudo foram apresentados na Tabela I. A idade variou entre 32 e 58 anos ($44 \pm 9,09$) para o GI, enquanto que para o GC variou de 43 a 54 anos ($47,25 \pm 5,31$). O tempo médio que os indivíduos no GI haviam sido diagnosticados com EM foi de $8,57 \pm 9,5$ anos e $7,75 \pm 7,22$ anos para o GC. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos com relação a idade e tempo de diagnóstico.

Os resultados das avaliações do controle postural, em valores de média e desvio-padrão, podem ser observados na Tabela II, onde são apresentadas as variáveis derivadas do COP de ambos os grupos, discriminando, paralelamente, os valores obtidos nos testes (pré e pós) e nas condições sensoriais adotadas para avaliação.

Tabela II – Controle postural de portadores de EM submetidos a equoterapia

Grupo	Condição	Teste	Variáveis do COP*			
			AMPap (cm)	AMPml (cm)	VMap (cm/s)	VMml (cm/s)
GI	OA	Pré	2,85±0,93	2,21±1,19	1,44±0,56	1,30±0,75
		Pós	2,28±0,68	1,66±0,79	1,48±0,46	1,19±0,59
	OF	Pré	3,91±1,70	3,28±2,12	1,91±0,79	1,70±0,99
		Pós	3,02±0,84	2,17±0,99	1,85±0,70	1,19±0,41
GC	OA	Pré	1,58±0,35	0,96±0,43	0,83±0,19	0,62±0,30
		Pós	1,89±0,99	0,96±0,63	0,97±0,28	0,72±0,18
	OF	Pré	2,39±1,71	1,41±0,67	0,99±0,27	0,69±0,26
		Pós	2,61±1,37	1,08±0,44	1,33±0,35	0,84±0,15

AMPap e AMPml - amplitude de deslocamento do COP nas direções ântero-posterior e médio-lateral, respectivamente; **VMap e VMml** – velocidade média de deslocamento do COP nas direções ântero-posterior e médio lateral, respectivamente.

A comparação múltipla das médias indicou diferenças significativas entre GI e GC ($p < 0,01$) nas variáveis do COP contemplados nesta análise, com predomínio de valores superiores no GI. Diferenças entre as condições sensoriais ($p < 0,01$) também foram constatadas, sendo verificados valores maiores, em ambos os grupos, quando a informação visual foi suprimida. Interações entre Pré e Pós teste e GI e GC foram observados na AMPap ($5,07_F$, $p < 0,01$) e VMml ($5,50_F$, $p = 0,02$). Assim, o teste de Tukey foi utilizado para localizar as significâncias dentro dessas interações.

A Figura I ilustra a distribuição dos valores de AMPap (A) e VMml (B), para GI e GC, em ambas as testagens.

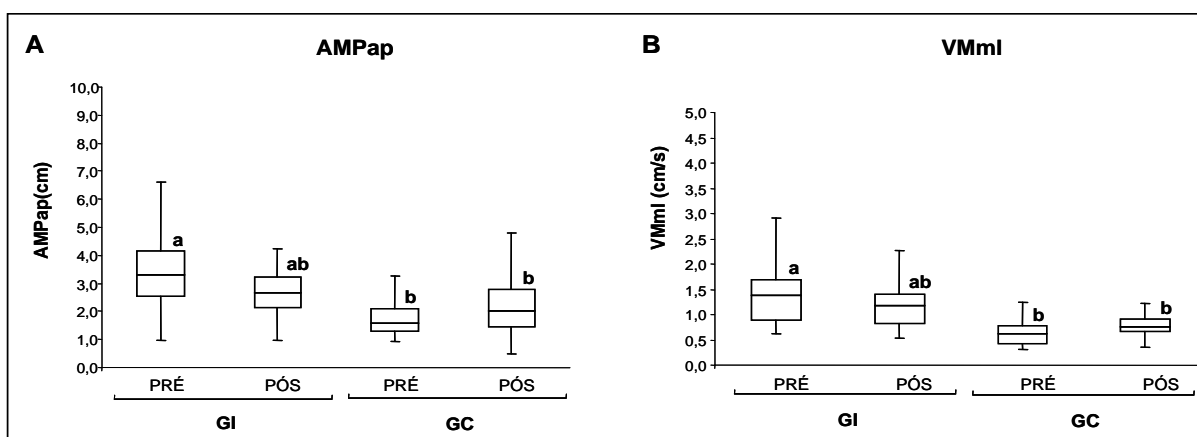


Figura I – Distribuição dos valores de AMPap (A) e VMml (B), para GI e GC, pré e pós intervenção. Teste de Tukey: Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias.

Quando comparados aos valores distribuídos do GI e GC observa-se a prevalência de valores maiores de AMPap (A) no teste inicial do GI. Já o pós-teste

indica uma redução significativa dos valores do GI, após o período de intervenção, enquanto que o GC manteve um comportamento constante em ambas as testagens. O teste de Tukey permitiu observar ainda, que com a redução dos valores de AMPap do GI, identificada depois da intervenção, as diferenças estatísticas entre os grupos são atenuadas. A presença das letras combinadas “ab” no GI indica paridade dos valores de ambos os grupos no pós-teste.

As mesmas considerações se aplicam à VMml, Figura I(B) que, embora demonstre valores mais baixos, apresentou uma conduta análoga a AMPap em ambos os grupos e testes.

Discussão

Este estudo se propôs a verificar se a estimulação através da equoterapia é capaz de desencadear alterações no controle postural de portadores de Esclerose Múltipla (EM). Em síntese, constatou-se que o GI manifestou controle postural mais comprometido do que o GC no teste inicial. Estes resultados eram esperados, uma vez que os grupos foram organizados intencionalmente conforme relato de instabilidade. Em ambos os grupos o desempenho foi piorado quando a informação visual foi suprimida. Após a estimulação, os sujeitos do GI foram capazes de reduzir os valores de todas as variáveis analisadas. No entanto, diferenças estatisticamente significativas foram evidenciadas somente para AMPap e VMml, ao passo que o GC manteve um comportamento inalterado entre as avaliações.

Padrões distintos de respostas observadas durante a avaliação do controle postural podem ser indicativos de diferentes tipos de comprometimentos. Porosińska *et al.*¹¹ sugerem que valores elevados nas amplitudes e velocidades de oscilação indicam disfunção do sistema de controle do equilíbrio. Nesse estudo, nós observamos que independente do grupo, as maiores oscilações e velocidades predominaram na direção antero-posterior (A-P).

Estudos congêneres observaram que a instabilidade postural está presente em pessoas com EM quando submetidas à diferentes condições de avaliação, incluindo a posição quieta^{7,11,12}. Quando comparados com controles saudáveis, os indivíduos com EM manifestam maiores oscilações, em ambos os planos de movimento¹², com predominância de valores superiores na direção A-P^{9,12}.

A observação do desempenho de indivíduos em inúmeros testes, posturas e situações que requerem adequação da estabilidade corporal sempre permearam os estudos do controle postural. No entanto, estudos atuais tem discutido o processo de controle postural e assim, tentam observar quais os mecanismos de controle predominantes em diferentes situações e/ou quais estão mais suscetíveis a comprometimentos desencadeados pelas mais diversas disfunções neurológicas.

Observações direcionadas a pessoas sem histórico de neuropatias sugerem que existem dois mecanismos ortogonais que controlam o COP. Enquanto as oscilações na direção A-P são, em grande parte, controladas pela estratégia do tornozelo (principalmente pelos flexores plantares), as oscilações na direção médio-lateral (M-L) são controladas pela estratégia do quadril^{26,27}. Em indivíduos com EM a relação entre os mecanismos utilizados para adequação da estabilidade postural ainda é pouco explorada. Chung *et al.*⁹, ao avaliar as associações entre a força e assimetrias de distribuição de peso durante o controle postural de indivíduos com EM, relataram que a variabilidade dos deslocamentos do centro de pressão, durante a postura quieta, é maior em EM, em comparação aos controles saudáveis, e que essas medidas posturais são correlacionados com menor força nos extensores do joelho e fadiga.

Pode ser observado que GI reduziu os valores de todas as variáveis analisadas após a estimulação com equoterapia. No entanto, diferenças estatisticamente significativas foram evidenciadas somente para AMPap e VMml, que fornecem indicativos de melhora no controle postural, ao passo que o GC manteve um comportamento inalterado entre as avaliações. Esses resultados corroboram com os achados que observaram melhora significativa nos escores de equilíbrio, após estimulação através da Equoterapia^{22,28}. Todavia, cabe destacar que em ambos os estudos mencionados, o equilíbrio foi avaliado pela escala de BERG.

Quando a informação visual foi suprimida ambos os grupos apresentaram piora no desempenho das variáveis do COP. Em estudo similar¹¹, o equilíbrio postural de um grupo de pacientes com EM foi avaliado por meio de testes clínicos e posturográficos, em diferentes condições sensoriais, e observaram a prevalência de déficits mais acentuados de estabilidade nas situações que inibiram a informação visual. Nesse mesmo estudo, ao comparar o desempenho dos indivíduos com EM com controles saudáveis, os autores constataram que, enquanto os pares saudáveis foram capazes de adequar a estabilidade postural, mesmo sem informação visual, a

ausência dessa informação afetou significativamente o controle postural dos acometidos pela EM. Na EM, as lesões do sistema nervoso central podem comprometer as funções sensoriais e alterar o controle postural^{12,19}. Assim, quando a informação visual é suprimida, há uma maior confiança nos outros sistemas sensoriais, alguns dos quais podem estar alterados na EM. Dessa forma, a dependência visual exigida para manutenção da estabilidade dos sujeitos investigados sugere deficiências em outros sistemas sensoriais.

Por se tratar de uma disfunção progressiva, os distúrbios e/ou comprometimentos associados à EM tendem a aumentar gradativamente. Martin *et al.*¹⁰ encontraram indicativos de deterioração funcional, mesmo na ausência de recidiva clínica, em indivíduos recém-diagnosticados com EM. Nessa perspectiva, estudiosos das mais variadas áreas de conhecimento, tem se dedicado a investigar a contribuição de medidas terapêuticas no processo de reabilitação para promover a independência funcional ou diminuir a sintomatologia desencadeada pela EM.

Abordagens como a fisioterapia convencional e exercícios físicos, entre outras técnicas de reabilitação, são frequentemente utilizadas na tentativa de melhorar a funcionalidade desses indivíduos, mas nem sempre comprovam sua efetividade. Alguns desses estudos tem mostrado que exercícios aeróbicos e resistidos não foram capazes de alterar parâmetros de mobilidade e controle postural de indivíduos com EM^{4,17}. Ao comparar os efeitos de diferentes estratégias sensoriais na reabilitação do equilíbrio postural de pessoas com EM, Cattaneo *et al.*²⁹ observaram que exercícios que utilizam estratégias sensoriais desencadearam melhores respostas no equilíbrio postural do que exercícios aeróbicos e resistidos. Nesse contexto, a estimulação equestre, realizada dentro do contexto da equoterapia, é considerada uma abordagem multissistêmica no tratamento de doenças neurológicas. Isso ocorre, pois há solicitação de constantes reações posturais, combinadas a dissociação das cinturas pélvica e escapular, provocando reações de retificação do tronco e ajustes tônicos que acionam os mecanismos de reflexos posturais^{21,22}.

Os resultados encontrados nesses estudos convergem à grande maioria dos estudos que investigaram a influência da estimulação equestre nas mais variadas disfunções neurológicas. Quando analisado o efeito da estimulação sobre variáveis que influenciam o controle postural, os estudos demonstram redução dos déficits de equilíbrio e adequação da estabilidade postural em portadores de EM^{22,28}.

Conclusões

Após um período de quatro meses, a estimulação através da equoterapia mostrou-se eficiente em desencadear alterações favoráveis no controle postural de portadores de EM. As melhorias foram identificadas através da redução das amplitudes e velocidades de oscilações, com maior ênfase da direção ântero-posterior.

O delineamento desse estudo possui algumas limitações que precisam ser consideradas. Essas residem principalmente na dificuldade de homogeneizar grupos de pessoas que possuam disfunções neurológicas e na definição clínica do tipo de EM que não pode ser estabelecida através do diagnóstico neurológico. Nesse sentido, mesmo considerando que os indivíduos pudessem possuir níveis de comprometimentos distintos a intervenção proposta surtiu efeito positivo no controle postural dos sujeitos investigados.

Referências

1. BCTRIMS. Brazilian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. Acesso em 27/08/2010. [homepage web] <http://www.bctrims.org.br>
2. KORNECK, B. LASSAMANN, H. Neuropathology of multiple sclerosis - new concepts. **Brain Research Bulletin** 61(3): 321-326, 2003.
3. MILLER, A.E. Clinic features (pág. 169-186). In: Cook S, ed. **Handbook of Multiple Sclerosis**. New York: Marcel Dekker, Inc., 3ª Ed., 1990.
4. DEBOLT, L.S.; MCCUBBIN, J.A. The effects of home-based resistance exercise on balance, power, and mobility in adults with multiple sclerosis. **Arch Phys Med Rehabil** 85: 290-297, 2004.
5. FINKELSZTEJN, A. et al. Clinical Features of Multiple Sclerosis in the South of Brazil. **Arq Neuropsiq** 67(4): 1071-1075, 2009.
6. PAPAIS-ALVARENGA, R.M. et al. Esclerose Múltipla (EM): Perfil clínico e evolutivo no município do Rio de Janeiro. **Revista brasileira Neurologia**. 31(2): 75-87, 1995.
7. FRZOVIC, D. et al. Clinical tests of standing balance: Performance of persons with multiple sclerosis. **Arch Phys Med Rehabil** 83: 215-221, 2000.

8. KARST, G.M.V. *et al.* Center of Pressure Measures during Standing Tasks in Minimally Impaired Persons with Multiple Sclerosis. **J Neurol Phys Ther.** 29(4): 170-180, 2005.
9. CHUNG, L.H. *et al.* Leg Power Asymmetry and Postural Control in Women with Multiple Sclerosis. **Medicine and Science in Sports and Exercise** 40(10): 1717-1724, 2008.
10. MARTIN, C.L. *et al.* Gait and balance parameters as clinical markers of disease progression in early multiple sclerosis. **18th Meeting of the European Neurological Society**, 2008.
11. POROSIŃSKA, A.P. *et al.* Evaluation of postural balance control in patients with multiple sclerosis – effect of different sensory conditions and arithmetic task execution. A pilot stud. **Neurologia i Neurochirurgia Polska** 44(1): 35–42, 2010.
12. VAN EMMERIK, R.E.R. *et al.* Postural control in women with multiple sclerosis: Effects of task, vision and symptomatic fatigue. **Gait & Posture** xx(xx): xxx-xxx, 2010.
13. SHUMWAY-COOK, A.; WOOLLACOTT, M.H. **Controle Motor: Teoria e Aplicações Práticas**, 2ª ed. São Paulo: Manole, 2003.
14. PETERKA, R.J. Sensorimotor integration in human postural control. **J Neurophysiol** 88(3): 1097–1118, 2002.
15. REULEN, J.P.H. *et al.* Eye-movement disorders in Multiple-Sclerosis and optic neuritis. **Brain** 106: 121-140, 1983.
16. WILLIAMS, N.P.; ROLAND, P.S.; YELLIN, W. Vestibular evaluation in patients with early multiple sclerosis. **Am J Otol.** 18:93–100, 1997.
17. ROMBERG, A.V. *et al.* Effects of a 6-month exercise program on patients with multiple sclerosis. **Neurology** 63: 2034–2038, 2004.
18. SOSNOFF, J. J. *et al.* Multiple Sclerosis and Postural Control: The Role of Spasticity. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation** 91(1): 93-99, 2010.
19. CATTANEO, D.; JONSDOTTIR, J. Sensory impairments in quiet standing in subjects with multiple sclerosis. **Mult Scler** 15(1): 59-67, 2009.
20. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EQUOTERAPIA [homepage na Internet]. Brasília: ANDE-BRASIL; Acesso em 03/07/2010. Disponível em: <http://www.equoterapia.org.br/equoterapia.php>
21. MEREGILLANO G. Hippotherapy. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America.** 15(4):843-54, 2004.

22. HAMMER, A. *et al.* Evaluation of therapeutic riding (Sweden)/ hippotherapy (United States). A single-subject experimental design study replicated in eleven patients with multiple sclerosis. **Physiotherapy Theory and Practice** 21(1): 51-77, 2005.
23. BENDA, W.; MCGIBBON, N.H.; GRANT, K. Improvements in muscle symmetry in children with cerebral palsy after equine-assisted therapy (hippotherapy). **J Altern Complement Med.** 9(6):817-825, 2003.
24. MCGIBBON, N.H. *et al.* Immediate and Long-Term Effects of Hippotherapy on Symmetry of Adductor Muscle Activity and Functional Ability in Children With Spastic Cerebral Palsy. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation** 90(6):966-74, 2009.
25. LASA, S.M.; FRANCHIGNONI, F. The role of animal-assisted therapy in physical and rehabilitation medicine. **European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine** 44(1):99-100, 2008.
26. WINTER, D.A. *et al.* Unified theory regarding AP and ML balance in quiet stance. **J Neurophysiol** 75:2334-43, 1996.
27. WINTER, D.A. *et al.* Motor mechanisms of balance during quiet standing. **Journal of Electromyography and Kinesiology** 13(1):49-56, 2003.
28. SILKWOOD-SHERER D, WARMBIER H. Effects of hippotherapy on postural stability, in persons with multiple sclerosis: a pilot study. **Journal of Neurologic Physical Therapy** 31(2): 77-84, 2007.
29. CATTANEO, D. *et al.* Effects of balance exercises on people with multiple sclerosis: a pilot study. **Clinical Rehabilitation** 21: 771–781, 2007.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mesmo com o avanço no entendimento das mais distintas expressões da EM, no que tange ao controle postural, há necessidade de estabelecer a relação dos mecanismos predominantes nas estratégias de controle postural, bem como quais os sistemas são mais afetados, afim de orientar efetivamente as estratégias de intervenção empregadas na tentativa de manter a funcionalidade dos sujeitos acometidos pela EM. Dessa, forma, sugere-se a realização de outros estudos com a manipulação de outros *inputs* sensoriais.

A utilização da equoterapia enquanto método terapêutico tem se tornado cada vez mais presente e despertado o interesse de muitos estudiosos. As pesquisas descrevem a sistematização do método e avaliações dos resultados frente a inúmeras síndromes, deficiências e comprometimentos neuromotores, assim como, nos planos psicossocial e educacional. Esses trabalhos tem alcançado bons resultados e evidenciado a validade da equoterapia enquanto recurso terapêutico complementar, além de aperfeiçoar sua aplicação e técnica. No entanto, as pesquisas que circundam esse método são recentes, e de certa maneira ainda incipientes. Acredita-se ser preciso explorar os processos de acomodação do estímulo produzido pela estimulação equestre e não somente ratificar a eficácia desse método terapêutico através de medidas de desempenho.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, L; FULLER, K. Equilíbrio e desordens vestibulares. In: UMPHERED, D. A. **Reabilitação neurológica**. 4ª ed. Barueri, SP: Manole, 2004.

ALMEIDA, S.B. *et al.* Efficiency of balance training in multiple sclerosis. **Fisioterapia em Movimento** 20(2): 41-48, 2007.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. 350(1):103-108, 1996.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EQUOTERAPIA [homepage na Internet]. Brasília: ANDE-BRASIL; Acesso em 03/07/2010. Disponível em: <http://www.equoterapia.org.br/equoterapia.php>.

BARELA, A.M.F.; DUARTE, M. **Utilização da plataforma de força para aquisição de dados cinéticos durante a marcha Humana**. 2006. Disponível em: [http://lob.incubadora.fapesp.br/portal.Acesso 14/09/2008](http://lob.incubadora.fapesp.br/portal.Acesso%2014/09/2008).

BARREIROS, A. L. B. S. *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova** 29(1): 113-123, 2006.

BCTRIMS. Brazilian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. Acesso em 27/08/2010. [homepage web] <http://www.bctrims.org.br>

BENDA, W.; MCGIBBON, N.H.; GRANT, K. Improvements in muscle symmetry in children with cerebral palsy after equine-assisted therapy (hippotherapy). **J Altern Complement Med**. 9(6):817-825, 2003.

BERG, K.O.M. *et al.* Clinical and laboratory measures of postural balance in an elderly population. **Arch Phys Med Rehabil**. 73(11): 1073-1080, 1992.

BECK, B.; VOGT, B.; KESSLER, J. Hippotherapy in neurologic rehabilitation. **Hippotherapie In Der Neurologischen Rehabilitation**.42(2):147-50, 1990.

BERTOTI, D.B. Effect of therapeutic horseback riding on posture in children with cerebral palsy. **Physical Therapy** 68(10): 1505-1512, 1988.

BIERY, M.J.; KAUFFMAN, N. The effects of therapeutic horseback riding on balance. **Adapted Physical Activity Quarterly** 6(3): 221-229, 1989.

BOHR, V. *et al.* Oxidative DNA damage processing and changes with aging. **Toxicology Letters** 103: 47-52, 1998.

CALEBRESI, P.A. Diagnosis and management of multiple sclerosis. **Am Fam Physician** 70:1935–1944, 2004.

CALLEGARO, D. et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brasil, 1997. **Acta Neurol Scand** 4: 208-213, 2001.

CALLEGARO, D.G. et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brasil, 1997. **Acta Neurol Scand** 4: 208 – 213, 2001.

CARR, J; SHEPHERD, R. **Reabilitação Neurológica: otimizando o desempenho motor**. Barueri – SP, Ed. Manole, 2008.

CASADY, R.L.; NICHOLS-LARSEN, D.S. The effect of hippotherapy on ten children with cerebral palsy. **Pediatr Phys Ther** 16(3): 165-172, 2004.

CATTANEO, D. et al. Effects of balance exercises on people with multiple sclerosis: a pilot study. **Clinical Rehabilitation** 21: 771–781, 2007.

CATTANEO, D. Risks of Falls in Subjects With Multiple Sclerosis. **Arch Phys Med Rehabil** 83: 864-867, 2002.

CATTANEO, D.; JONSDOTTIR, J. Sensory impairments in quiet standing in subjects with multiple sclerosis. **Mult Scler** 15(1): 59-67, 2009.

CHERNG, R. et al. The effectiveness of therapeutic horseback riding in children with spastic cerebral palsy. **Adapted Physical Activity Quarterly** 21(2):103-121, 2004.

CHUNG, L.H. et al. Leg Power Asymmetry and Postural Control in Women with Multiple Sclerosis. **Medicine and Science in Sports and Exercise** 40(10): 1717-1724, 2008.

COLLINS A, et al. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutat Res-DNA Repair** 336(1):69-77, 1995.

COOKE, M. S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **Faseb Journal** 17(10): 1195-1214, 2003.

COPETTI, F. et al. Angular kinematics of the gait of children with Down's syndrome after intervention with hippotherapy. **Brazilian Journal of Physical Therapy** 11(6): 503-507, 2007.

COZBY, P. **Métodos de pesquisa e ciências do comportamento**. São Paulo: Atlas, 2003.

DAVID, SZ. Adaptação Vestibular (pág. 77-90). In: HERDMAN, SJ. **Reabilitação vestibular**. Manole 2ª edição. São Paulo, 2002.

DEBOLT, L.S.; MCCUBBIN, J.A. The effects of home-based resistance exercise on balance, power, and mobility in adults with multiple sclerosis. **Arch Phys Med Rehabil** 85: 290-297, 2004.

D'ERRICO, M. *et al.* Mechanism of oxidative DNA damage repair and relevance to human pathology. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research** 659(1-2): 4-14, 2008.

DUARTE, M. Análise estabilográfica da postura ereta humana quasi-estática. **Tese**. Escola de Educação Física e Esporte Universidade de São Paulo, 2000.

EVANS, M. D. *et al.* Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research** 567(1): 1-61, 2004.

FAIRBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEILL KL (1995). The Comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research** 339: 37-59.

FINKELSZTEJN, A. *et al.* Clinical Features of Multiple Sclerosis in the South of Brazil. **Arq Neuropsiq** 67(4): 1071-1075, 2009.

FRANKEL, D. Esclerose Múltipla. In: UMPHERED, D. A. **Reabilitação neurológica**. 4ª ed. Barueri, SP: Manole, 2004.

FRZOVIC, D. *et al.* Clinical tests of standing balance: Performance of persons with multiple sclerosis. **Arch Phys Med Rehabil** 83: 215-221, 2000.

FURTADO, O. L. P. C.; TAVARES, M. C. G. C. F. Orientação de exercícios físicos para pessoas com Esclerose Múltipla. **Efdeportes Revista Digital** (11) 99:2006. Disponível em <http://www.efdeportes.com/>. Acesso 15/05/2009.

GILGUN-SHERKI, Y. *et al.* The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. **Journal of Neurology** 251(3): 261-268, 2004.

GRZESIUK, A. K. Características clínicas e epidemiológicas de 20 pacientes portadores de esclerose múltipla acompanhados em Cuiabá - Mato Grosso. **Arq Neuropsiquiatr** 64(3-A): 635-638, 2006.

HAEHL, V. *et al.* Influence of hippotherapy on the kinematics and functional performance of two children with cerebral palsy. **Pediatric Physical Therapy** 11(2): 89-101, 1999.

HAMILL, D. *et al.* The effect of hippotherapy on postural control in sitting for children with cerebral palsy. **Phys Occup Ther Pediatr** 27(4): 23-42, 2007.

HAMMER, A. *et al.* Evaluation of therapeutic riding (Sweden)/ hippotherapy (United States). A single-subject experimental design study replicated in eleven patients with multiple sclerosis. **Physiotherapy Theory and Practice** 21(1): 51-77, 2005.

HARTMANN, A. *et al.* Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis** 18 (1): 45-51, 2003.

KADLOGLU, E.S. *et al.* Detection of oxidative DAN damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. **Biomarkers** 9(2): 203-209, 2004.

KARST, G.M.V. *et al.* Center of Pressure Measures during Standing Tasks in Minimally Impaired Persons with Multiple Sclerosis." *J Neurol Phys Ther.* 29(4): 170-180, 2005.

KESHNER, E. A. Anormalidades Posturais nas Disfunções Vestibulares (pág. 52-76). In: HERDMAN, SJ. **Reabilitação vestibular**. Manole 2ª edição. São Paulo, 2002.

KORNECK, B. LASSAMANN, H. Neuropathology of multiple sclerosis - new concepts. **Brain Research Bulletin** 61(3): 321-326, 2003.

KRAPIVKIN, A. *et al.* Effect of intensive course of hipotherapy at children with cerebral palsy. **Brain Dev.** 23:189, 2001.

KUCZYNSKIM, M.; SLONKA, K. Influence of artificial saddle riding on postural stability in children with cerebral palsy. **Gait & Posture** 10:154-160, 1999.

LANA-PEIXOTO, M.A. *et al.* Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento da Esclerose Múltipla. **Arq Neuropsiquiatr** 60(3-B): 881-886, 2002.

LASSAMANN, H.; LUCCHINETTI, C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. **Trends Mol. Med.** 7: 115-121, 2001.

LECHNER, H.E., *et al.* The effect of hippotherapy on spasticity and on mental well-being of persons with spinal cord injury. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation** 88: 1241-1248, 2007.

LEVINE, S.M. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Med Hypotheses.* 39:271-4, 1992.

LU, F.M. *et al.* Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences** 177(2): 95-103, 2000.

LUBLIN, FD, REINGOLD, SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical trials of New Agents in Multiple sclerosis. **Neurology** 46:907-911, 1996.

LUNDY-EKMAN, L. **Neurociência: Fundamentos para a Reabilitação**. Elsevier, 3ª Ed. 2008.

LUCCHINETTI, C. *et al.* Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination . **Ann. Neurol.** 27: 707-717, 2000.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

MARTIN, C.L. *et al.* Gait and balance parameters as clinical markers of disease progression in early multiple sclerosis. **18th Meeting of the European Neurological Society**, 2008.

MCGEE MC, REESE N. Immediate effects of a hippotherapy session on gait parameters in children with spastic cerebral palsy. **Pediatr Phys Ther** 21: 212-218, 2009.

MEDEIROS, M.; DIAS, E. **Equoterapia: Bases e fundamentos**. Rio de Janeiro, Revinter, 2002.

MEREGILLANO G. Hippotherapy. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**. 15(4):843-54, 2004.

MILLER, A.E. Clinic features (pág. 169-186). In: Cook S, ed. **Handbook of Multiple Sclerosis**. New York: Marcel Dekker, Inc., 3ª Ed., 1990.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Multiple sclerosis resources in the world (2008). Disponível em <http://www.who.int/en/> acesso 19/05/09.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 123: 291-298, 1984.

PAPAI-ALVARENGA, R.M. *et al.* Esclerose Múltipla (EM): Perfil clínico e evolutivo no município do Rio de Janeiro. **Revista brasileira Neurologia**. 31(2): 75-87, 1995.

PAPAI-ALVARENGA, R.M.; ALVARENGA, H. Esclerose Múltipla manifestações clínicas, aspectos epidemiológicos e critérios diagnósticos. **Revista brasileira de Neurologia**. 31(2):61-70, 1995.

PAVAN, K. *et al.* Reabilitação vestibular em pacientes com esclerose múltipla remittente-recorrente. **Arq Neuropsiquiatr** 65 (2-A): 332-335, 2007.

PETERKA, R.J. Sensorimotor integration in human postural control. **J Neurophysiol** 88(3): 1097–118, 2002.

PETERSON, E.W.; CHO, C.C.; FINLAYSON, M.L. . Fear of falling and associated activity curtailment among middle aged and older adults with multiple sclerosis." **Multiple Sclerosis** 13: 1168–1175, 2007.

POROSIŃSKA, A. P. *et al.* Evaluation of postural balance control in patients with multiple sclerosis – effect of different sensory conditions and arithmetic task execution. A pilot stud. **Neurologia i Neurochirurgia Polska** 44(1): 35–42, 2010.

RAO, K. S. Free Radical Induced Oxidative damage to DNA: Relation to Brain Aging and Neurological Disorders. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics** 46(1): 9-15, 2009.

REDDY, V. P. *et al.* Oxidative Stress in Diabetes and Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimers Disease** 16(4): 763-774, 2009.

REULEN, J.P.H. *et al.* Eye-movement disorders in Multiple-Sclerosis and optic neuritis. **Brain** 106: 121-140, 1983.

RODGERS, M. *et al.*, Gait characteristics of individuals with MS before and after a 6 month aerobic training program. **J Rehab Res Dev.** 36(3):183–188, 1999.

ROMBERG, A.V. *et al.* Effects of a 6-month exercise program on patients with multiple sclerosis. **Neurology** 63: 2034–2038, 2004.

ROSS, G.M.; MCMILLAN, T.J. WILCOX, P.; COLLINS, A.R. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. **Mutation Research** 337: 57-60, 1995.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 38: 995-1014, 2005.

SHARMA, K.R.; KENT-BRAUN, J.A.; MYNHIER, M.A.; WEINER, M.W.; MILLER, R.G. Evidence of an abnormal intramuscular component of fatigue in multiple sclerosis. **Muscle Nerve** 18:1403-11, 1995.

SHUMWAY-COOK A, WOOLLACOTT MH. **Controle Motor: Teoria e Aplicações Práticas**, 2ª ed. São Paulo: Manole, 2003.

SHURTLEFF TE, ENGSBERG JR. Changes in Trunk and Head Stability in Children with Cerebral Palsy after Hippotherapy: A Pilot Study. **Physical & Occupational Therapy in Pediatrics.** 30(2):150-63, 2010.

SHURTLEFF TL, STANDEVEN JW, ENGSBERG JR. Changes in Dynamic Trunk/Head Stability and Functional Reach After Hippotherapy. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.** 90(7):1185-95, 2009.

SILKWOOD-SHERER D, WARMBIER H. Effects of hippotherapy on postural stability, in persons with multiple sclerosis: a pilot study. **Journal of Neurologic Physical Therapy** 31(2): 77-84, 2007.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.** 175: 184-191, 1988.

SOSNOFF, J. J. *et al.* Multiple Sclerosis and Postural Control: The Role of Spasticity. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation** 91(1): 93-99, 2010.

STERBA, J.A. *et al.* Horseback riding in children with cerebral palsy: effect on gross motor function. **Developmental Medicine and Child Neurology** 44(5): 301-308, 2002.

THOMAS, J. R.; NELSON, J. R. **Métodos de Pesquisa em Atividade Física**. 3^o ed. Artmed, 2002.

TOIGO, T.; LEAL JR., E.; ÁVILA, S.N. The use of hippotherapy as therapeutic resource to improve the static balance in elderly individuals. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia** 11(3): 391-403, 2008.

TOMAZ, A. et al. Sinais e Sintomas associados a alterações otoneurológicas diagnosticadas ao exame vestibular computadorizado em pacientes com esclerose múltipla. **Arquivo Neuropsiquiatria**. 63 (3-B), p.837-742, 2005.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions** 160:1-40, 2006.

VAN DER GOES, A. *et al.* Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages. **Journal of Neuroimmunology** 92(1-2): 67-75, 1998.

VAN EMMERIK, R.E.R. *et al.* Postural control in women with multiple sclerosis: Effects of task, vision and symptomatic fatigue. **Gait & Posture** xx(xx): xxx-xxx, 2010.

VAN HORSSSEN, J.S. *et al.* Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. **Free Radical Biology and Medicine** 45(12): 1729-1737, 2008.

VASCONCELOS, S. M. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova** 30(5): 1323-1338, 2007.

WILLIAMS, N.P.; ROLAND, P.S.; YELLIN, W. Vestibular evaluation in patients with early multiple sclerosis. **Am J Otol.** 18:93–100, 1997.

WINCHESTER, P. *et al.* The effect of therapeutic horseback riding on gross motor function and gait speed in children who are developmentally delayed. **Physical & Occupational Therapy in Pediatrics** 22(3/4): 37-50, 2002.

7 ANEXOS

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do estudo: Efeito da Equoterapia sobre o equilíbrio corporal e a relação com dano no Dna de indivíduos com Esclerose Múltipla

Pesquisadores: Prof^a. Msd^a. Karla Mendonça Menezes, Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira, Prof. Dr. Fernando Copetti.

Instituição: UFSM/ Centro de Ciências da Saúde

Telefone para contato: (55) 9939-1567 / 3220-8877

Local da coleta de dados: Laboratório de Pesquisa e Ensino do Movimento Humano

A mestrandia Karla Mendonça Menezes, do Programa de Pós-Graduação em Distúrbio da Comunicação Humana desenvolverá junto ao projeto de Equoterapia da Universidade Federal de Santa Maria um estudo com pacientes portadores de Esclerose Múltipla. Este será supervisionado pelos Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira (orientador) e Prof. Dr. Fernando Copetti (coordenador do Projeto de Equoterapia).

Esta pesquisa tem por objetivo analisar as possíveis alterações no equilíbrio através da equoterapia em indivíduos com Esclerose Múltipla e se justifica pelas melhorias que podem ser adquiridas na independência para as atividades diárias (alimentação, vestuário e higiene).

Para participar do estudo, o indivíduo voluntário passará por uma avaliação de equilíbrio em situações como: permanecer em pé sem se apoiar, ficar em pé com os dois pés juntos, permanecer em pé com os olhos fechados. Além disso, iremos coletar uma amostra de 5 ml de sangue para avaliar se há danos perceptíveis no Dna dos sujeitos, ou seja, análise de possíveis alterações nas células sanguíneas submetidas a testes específicos.

As sessões de equoterapia serão realizadas no Centro de Educação Física e Desportos e na Associação Eqüestre da UFSM (sedes do Projeto de Equoterapia) durante vinte semanas, onde cada uma terá duração de cinqüenta minutos, incluindo o tempo de aproximação, monta e encerramento, em dias fixos a serem combinados de acordo com a sua disponibilidade, entre os meses de agosto e dezembro de 2009. Terminado o período de tratamento (20 semanas) será feita uma nova avaliação, para comparar os resultados.

Este estudo poderá apresentar alguns desconfortos gerados pela postura sentada sobre o cavalo e/ou pela coleta de sangue (como dor no local da picada, calor, aparecimento de mancha roxo no local da punção) no entanto, serão tomados todos os cuidados de assepsia (higiene) e técnicas específicas de coleta. Você não será identificado em nenhum momento, sendo respeitada a sua privacidade e o material coletado ficará disponível a sua consulta em qualquer momento, sendo os dados referentes ao equilíbrio postural armazenados sob a responsabilidade dos pesquisadores e as amostras sanguíneas inutilizadas e descartadas após as análises.

O transporte até o local das sessões será por sua conta e não haverá despesas pessoais para você durante as avaliações e atendimentos. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Análise das alterações no equilíbrio através da equoterapia em indivíduos portadores de esclerose múltipla”.

Eu discuti com os pesquisadores sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Ciente e de acordo com o que foi exposto, eu _____, RG _____ estou de acordo com a participação nesta pesquisa, assinando este consentimento.

Santa Maria, _____ de _____ 2009.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Santa Maria, ____ de _____ de 2009

Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira
Orientador

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-UFSM
Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria – 7º andar – Campus Universitário – 97105-900 – Santa
Maria-RS - tel.: (55) 32209362 - email: comiteeticapesquisa@mail.ufsm.br

ANEXO B – TERMO DE CONFIDENCIALIDADE

Título do estudo: Efeito da Equoterapia sobre o equilíbrio corporal e a relação com dano no Dna de indivíduos com Esclerose Múltipla

Pesquisador(es) responsável(is): Prof. Karla Mendonça Menezes e Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira, Prof. Dr. Fernando Copetti

Instituição: UFSM/ Centro Ciências da Saúde

Telefone para contato: (55) 9939-1567 / 3220-8877

Local da coleta de dados: Laboratório de Pesquisa e Ensino do Movimento Humano – CEFD/UFSM

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos participantes. Concordam, igualmente, que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente estudo. As informações somente poderão ser divulgadas sem a identificação dos sujeitos. As amostras sanguíneas serão descartadas logo tenham sido analisadas. As fichas de coleta referentes a análise do equilíbrio postural bem como relatórios das sessões de atendimento pela Equoterapia serão armazenados junto ao projeto de Equoterapia no Centro de Educação Física e Desportos, para formação de banco de dados sob responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Copetti.

Santa Maria,dede 2009.

Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira
Orientador

Karla Mendonça Menezes
Mestranda do PPGDCH

ANEXO C – ANAMNESE

Pedimos para que responda os seguintes questionamentos que têm por objetivo caracteriza-lo. Seu nome será mantido em sigilo, só é necessário que você preencha para que possamos identificá-lo para a análise.

Dados de Identificação	
Nome: _____	Telefone: _____
Data de Nasc: __/__/__	Profissão: _____
Sexo: () masc. () fem.	

Histórico Médico		
Marque as intervenções cirúrgicas que você tenha feito:		
<input type="checkbox"/> Coluna	<input type="checkbox"/> Articulação	<input type="checkbox"/> Hérnia de disco
<input type="checkbox"/> Coração	<input type="checkbox"/> Olhos	<input type="checkbox"/> outros

Marque o(s) problemas(s) abaixo que tenha sido diagnosticado ou tratado:		
<input type="checkbox"/> Problemas oculares	<input type="checkbox"/> Alcoolismo	<input type="checkbox"/> Asma
<input type="checkbox"/> Pressão arterial alta	<input type="checkbox"/> Artrite	<input type="checkbox"/> Problemas musculares
<input type="checkbox"/> Úlcera	<input type="checkbox"/> Diabetes	<input type="checkbox"/> Outros

Você faz uso de medicamentos? Quais? Com que frequência?
--

Nos últimos tempos, você sofreu algum acidente ou lesão ósteo-articular?
--

Você Fuma? Com que frequência?

Histórico Esclerose Múltipla
Há quanto tempo ocorreu o 1º surto?
Quantos surtos ao total você já teve?
Quando foi o último surto?
Você sente algum desconforto?
Sente dificuldade de equilibrar-se?
Tem queixa de tontura ou quedas?

ANEXO D – PROTOCOLO TESTE COMETA

(Singh, 1988)

- **Soluções utilizadas**

- Tampão fosfato pH 7.4
- Solução de Lise
- Tampão para eletroforese
- Tampão neutralizador pH 7.5
- Agarose 1,5%
- Agarose low melting 0,75%
- Solução Fixadora
- Soluções de coloração com prata
- Solução stop de coloração
- Tripsina 0,48%

- **Preparo das Soluções**

1) Tampão fosfato (PBS) 10X pH 7,4

- Pesar 80,0g de NaCl, 2,0g de KCl, 21.7g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0g de KH_2PO_4 .
 - Colocar em um béquer e dissolver em água miliQ, lavar o béquer e colocando na proveta de 1000mL e acertar o volume.
 - SOLUÇÃO DE USO: diluir 10x e ajustar o pH para 7,4 (NaOH ou HCl).
 - Armazenar a solução na geladeira.

2) Solução de Lise

- Pesar 146,1g de NaCl, 37,2g de EDTA e 1,2g de Tris base, colocar em um béquer e adicionar +/- 800 mL de H_2O miliQ.
- Ajustar o pH com pérolas de NaOH (em torno de 8g) para 10 á 10,5.
- Completar o volume para 890mL em uma proveta, guardar em temperatura ambiente.
- SOLUÇÃO DE USO: no momento do uso adicionar 1mL de Triton X-100 e 10 mL de DMSO á 89 mL de solução de lise e colocar na geladeira.

3) Tampão para eletroforese (NaOH 300mM/1mM EDTA) pH>13

- Solução A: Pesar 200g de NaOH e dissolver em 500 mL de água destilada. E Armazenar em temperatura ambiente.
- Solução B: Pesar 14,89g de EDTA e dissolver em 180 mL de água destilada. Corrigir o pH para 10. Ajustar o volume para 200mL. Armazenar a solução a temperatura ambiente.
- SOLUÇÃO DE USO: Preparar somente no momento do uso. Pipetar 30mL da solução A e 5mL da solução B. Completar para 1L com água destilada gelada e armazenar na geladeira até o momento do uso.

4) Tampão neutralizador pH 7,5

- Pesar 48,5g de Tris base e dissolver em 950 mL de água destilada.
- Corrigir o pH para 7,5 com HCl.
- Completar o volume para 1L e armazenar na geladeira.

5) Agarose 1,5% (pré cobertura das lâminas)

- Pesar 1,80g de agarose normal e dissolver em 120mL de PBS pH 7,4.
- Aquecer no microondas até borbulhar 2x.
- Armazenar na geladeira tampado.

6) Agarose low melting (LMP) 0,75% (para uso com as células)

- Pesar 0,15g de agarose LMP e dissolver em 20mL de PBS pH 7,4.
- Aquecer no microondas até borbulhar 2x.
- Armazenar em vários ependorfs na geladeira.

7) Solução fixadora (para coloração com nitrato de prata)

- 15% de ácido tricloroacético, 5% de sulfato de zinco heptahidratado e 5% de glicerol.
- Pesar 150g de TCA, 50g de sulfato de zinco e pipetar 50mL de glicerol.
- Dissolver em água e completar o volume para 1L.
- Manter a solução em temperatura ambiente.

8) Solução de coloração com prata

- Solução A (carbonato de sódio 5%): pesar 25g de carbonato de sódio e dissolver em água destilada. Completar o volume para 500mL. Armazenar na temperatura ambiente.
- Solução B (nitrato de amônia 0,1%, nitrato de prata 0,1%, 0,25% ácido tungstosilícico e 0,15% de formaldeído): Pesar 0,5g de nitrato de amônia, 0,5g de nitrato de prata, 1,25g de ácido tungstosilícico e pipetar 0,75mL de formaldeído (se for 100%) dissolver em água destilada. Completar o volume para 500mL. Armazenar a temperatura ambiente.
- SOULUÇÃO DE USO: Preparar na hora do uso, 60mL da solução A e 30 mL da solução B. Misturar em um béquer.

9) Solução STOP de coloração (ácido acético 1%)

- Pipetar 10mL de ácido acético (se 100%) e adicionar em um béquer com água.
- Completar o volume para 1L.
- Armazenar a temperatura ambiente.

10) Tripsina 0,48%

- Diluir e congelar imediatamente após diluição.

• **Preparo das Células**

Leucócitos:

- misturar 5µL de leucócitos com 90µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) em um tubo de microcentrifuga e espalhar sobre a lâmina.

Sangue total:

- misturar 5µL de sangue com 90µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) em um tubo de microcentrifuga e espalhar sobre a lâmina.

Linfócitos isolados:

- misturar 20µL de sangue com 1mL RPMI em tubo de microcentrifuga, adicionar 100µL de Ficoll com cuidado para não misturar.

Cultura de células:

- tratar as células com tripsina (período curto, parar a reação adicionando meio) para obter uma suspensão de aproximadamente 1×10^6 células/mL. Adicionar 10µL da suspensão celular a 90µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e espalhar sobre a lâmina.

Tecidos (camundongo):

- remover pequeno pedaço do órgão e colocar em 1mL HBSS com 20mM EDTA no gelo. Desprender o tecido em pedaços finos e deixar sedimentar.
- adicionar 5µL de suspensão celular a 90µL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) e espalhar sobre a lâmina.
- para os tecidos de fácil desagregação (baço) adicionar 2 a 3x mais HBSS e utilizar 5µL para a preparação da lâmina. Para o fígado, cortar em pedaços grandes, trocar a solução de HBSS, cortar em pedaços pequenos. Utilizar 5-10µL na preparação da lâmina. Para medula

óssea, perfurar o fêmur com 1mL de HBSS frio em tubo de microcentrífuga, utilizar 5µL na preparação da lâmina.

- **Preparação das lâminas**

Material:

- lâminas de microscopia (extremidade fosca);
- lamínulas (25x50mm)
- agarose LPM 0,75%
- micropipetadores e ponteiras;
- banho-maria (37°C)

Procedimento:

- *Pré-cobertura das lâminas com agarose:* Ferver a agarose 1,5% em frasco que sirva a lâmina e colocar no banho-maria (60°C). Mergulhar as lâminas, deixando a ponta fosca de fora. Escorrer e deixar secar a temperatura ambiente ou na estufa a 37°C por 2h. As lâminas pré-cobertas podem ser preparadas antes e armazenadas umas sobre as outras enroladas em um plástico (manter bem secas e longe da umidade).
- Ferver a agarose LMP e colocar no banho-maria 37°C.
- Misturar 5-10µL da suspensão celular (5000-50000 células) a 90µL de agarose LMP.
- Adicionar a mistura (imediatamente) a uma lâmina de microscopia com pré-cobertura.
- Rapidamente dispor uma lamínula sobre o conteúdo.
- Manter as lâminas sob refrigeração até que o conteúdo solidifique (5 minutos aproximadamente).

- **Lise**

Material:

- solução de lise
- cubetas de vidro cobertas com papel alumínio.

Procedimento:

- Remover as lamínulas.
- Imergir as lâminas m tampão de lise gelado (preparado com uma hora de antecedência pela adição imediatamente antes do uso de 89mL de solução de lise a 10mL de DMSO e 1mL de Triton X-100).
- Manter as lâminas nesta solução por no mínimo 1h (até 4 semanas), para a remoção das membranas e citoplasma das células.

- **Desenovelamento e eletroforese**

Material:

- Solução A (NaOH)
- Solução B (EDTA)
- Cuba de eletroforese horizontal
- Fonte de eletroforese (25V, 300mA)
- Água destilada gelada
- Gelo

Procedimento:

- Retirar as lâminas da solução de lise, uma a uma, removendo com papel toalha o excesso de solução de lise e dispô-las, imediatamente, na cuba de eletroforese que deve estar dentro de um recipiente com gelo (4°C).
- Adicionar tampão de eletroforese feito na hora (no caso do ensaio alcalino: 300mM NaOH e 1mM EDTA em água destilada para um pH final>13) e encubar por 20-40 minutos (no caso de sangue total e leucócitos 20min).

- Submeter as lâminas à eletroforese por 10-40 minutos (20 minutos na maioria dos casos, sangue total e leucócitos) a 25V e 300mA (corrente controlada com o volume do tampão).

OBS: TODO O PROCEDIMENTO, DESDE A PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO CELULAR, DEVE SER EXECUTADO NO ESCURO OU SOB LÂMPADA DE COR AMARELA OU VERMELHA DE BAIXA INTENSIDADE PARA EVITAR DANO ADICIONAL NO DNA.

- **Neutralização, Fixação e Coloração**

Material

- Solução neutralizadora Tris 0,4M (pH 7,5)
- Bandejas

Procedimento:

- Retirar as lâminas da cuba de eletroforese, removendo o excesso de tampão e dispô-las sobre uma bandeja.
- Adicionar tampão de neutralização Tris 0,4M (pH 7,5) e esperar 5 minutos.
- Retirar o tampão e repetir o processo por mais 2x.
- Lavar 2x com água destilada
- Secar as lâminas 1,5-2h 37°C ou (*Over Night*).

- **Fixação**

Material

- Solução fixadora
- Cubeta de vidro

Procedimento:

- Colocar as lâminas em uma cubeta e adicionar ~100mL de solução fixadora e deixar em repouso por 10 minutos.
- Lavar 3x com água destilada
- Secar as lâminas 1,5-2h 37°C ou (*Over Night*).

- **Coloração**

Material

- Solução coloração A
- Solução coloração B
- Cubeta de vidro revestida com papel alumínio
- Banho-maria 37°C
- Solução STOP coloração

Procedimento:

- Hidratar as lâminas 5 minutos com água destilada (dentro da cubeta)
- Corar por aproximadamente 30 minutos na solução de coloração (60mL de A+ 30mL de B) a 37°C (até a solução começar escurecer).
 - Lavar 3x com água destilada
 - Deixar 5 minutos na solução STOP
- Lavar 3x com água destilada
 - Secar as lâminas a temperatura ambiente.

- **Análise**

Material:

- Microscópio de luz comum.

Procedimento:

- Analisar 50 ou 100 células (em cada lâmina da duplicata e fazer a média depois).
- Classificar as células de acordo com o formato da imagem em quatro classes de dano, variando de 0 (nenhum dano) a 4 (dano máximo). A soma desses valores forneceu um índice de dano único para cada tratamento. Tal índice pode oscilar entre 0 (50 células x 0) e 200 (50x4) para o caso da análise de 50 células e de 0 a 400 para o caso de 100 células.
- Como uma variável adicional pode-se medir o comprimento dos cometas (do início da cabeça até a ponta da cauda) com o auxílio de uma ocular com escala (recomenda-se um aumento de 200x)

Exemplo:*Índice de danos*

Classe 0: 25	$25 \times 0 = 0$
Classe 1: 30	$30 \times 1 = 30$
Classe 2: 23	$23 \times 2 = 46$
Classe 3: 15	$15 \times 3 = 45$
Classe 4: 7	$7 \times 4 = 28$

Total de células: 100

Índice de danos: 149

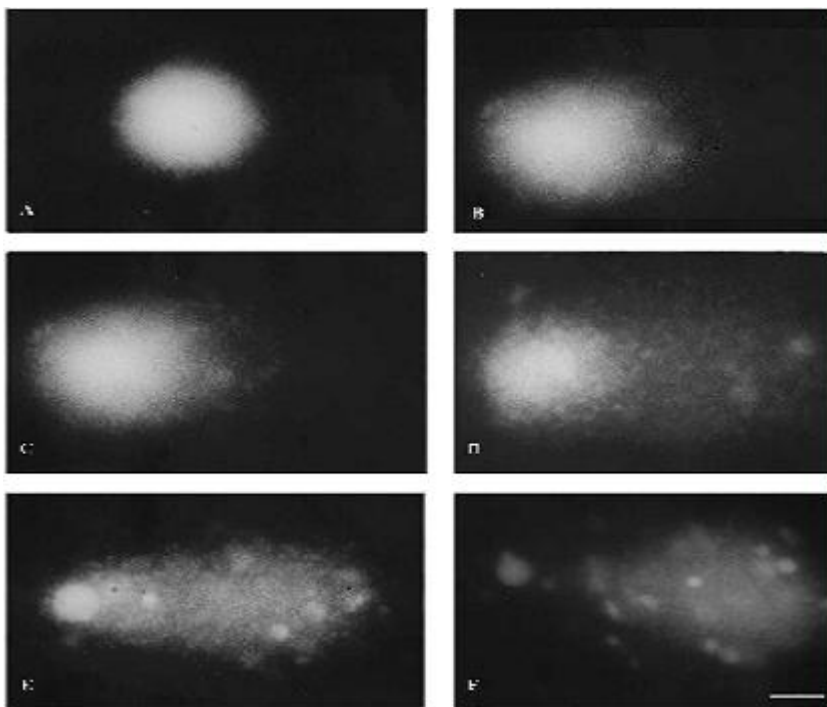
Classificação de danos

Figura 1 – Classificação de danos no Teste Cometa. A: dano 0, B: dano 1, C: dano 2, D: dano 3, E: dano 4, F apoptose (morte celular), (Östling & Johanson, 1984).