

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA
MESTRADO

LUCAS ATHAYDES MARTINS

**ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE DO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL PARA
AVALIAÇÃO DA ADAPTABILIDADE DA MARCHA EM MURINOS**

Porto Alegre
2020

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

LUCAS ATHAYDES MARTINS

**ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE DO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL
PARA AVALIAÇÃO DA ADAPTABILIDADE DA MARCHA EM MURINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito obrigatório para a obtenção do título de mestre em Gerontologia Biomédica.

Área de concentração: Aspectos biológicos do envelhecimento.

Orientador: Prof. Dr. Régis Gemerasca Mestriner

PORTO ALEGRE,

2020

Ficha Catalográfica

M386a Martins, Lucas Athaydes

Análise da Reprodutibilidade do Teste da Escada Horizontal para
Avaliação da Adaptabilidade da Marcha em Murinos / Lucas
Athaydes Martins . – 2020.

52.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Gerontologia Biomédica, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Régis Gemerasca Mestriner.

1. Marcha. 2. Caminhada. 3. Camundongos. 4. Ratos. I. Mestriner,
Régis Gemerasca. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

LUCAS ATHAYDES MARTINS

**ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE DO TESTE DA ESCADA HORIZONTAL
PARA AVALIAÇÃO DA ADAPTABILIDADE DA MARCHA EM MURINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito obrigatório para a obtenção do título de mestre em Gerontologia Biomédica.

Área de concentração: Aspectos biológicos do envelhecimento.

Orientador: Prof. Dr. Régis Gemerasca Mestriner

Aprovado em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw - PUCRS

Dra. Andréa Wieck-Ricachenevsky- PUCRS

Porto Alegre

2020

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor Doutor Régis Gemerasca Mestriner pelas muitas oportunidades de aprendizado desde o período da graduação.

Aos meus colegas do grupo interdisciplinar de pesquisa em neuroplasticidade e reabilitação (NEUROPLAR), especialmente a minha colega Aniuska Schiavo pela sua dedicação e companheirismo neste trabalho.

Aos meus familiares e amigos que estiveram do meu lado me apoiando em todos os momentos desse período de aprendizagem.

Por fim, agradeço a CAPES pela concessão da bolsa de estudos integral que me permitiu dedicação exclusiva durante a elaboração do trabalho.

Resumo

Entender os mecanismos neurobiológicos que podem estar envolvidos na adaptabilidade da marcha é de suma importância para desenvolver futuras estratégias de reabilitação para as disfunções de mobilidade funcional, seja em decorrência de doenças neurológicas ou de outras condições relacionadas ao envelhecimento. O Teste da Escada Horizontal (TEH) tem sido amplamente utilizado para avaliar a marcha normal e patológica em modelos murinos, pois permite detalhar a forma com a qual o animal faz a colocação dos membros anteriores e posteriores durante o teste, por meio de um sistema de pontuação específico. No entanto, embora seja empregado na literatura, o TEH ainda não foi validado quanto à sua reprodutibilidade intra e inter avaliador. Portanto, o presente estudo tem por objetivo estudar a reprodutibilidade do TEH, com vistas a determinar o seu nível de confiabilidade. Para a realização do estudo, empregou-se 40 vídeos de murinos oriundos de um banco de dados do laboratório (20 vídeos de ratos Wistar e 20 de camundongos C57BL/6, ambos adultos) realizando o TEH. Dois avaliadores independentes (com e sem experiência prévia com o teste) analisaram os vídeos, sendo que cada uma das filmagens foi analisada duas vezes, às cegas, pelo mesmo avaliador, totalizando 80 análises por avaliador. A concordância dos escores foi testada por meio do índice de correlação intraclassa (ICC). Os resultados demonstraram que os avaliadores I e II obtiveram uma excelente concordância para os ratos no escore total combinado (ICC = 0,961 / $p = 0,0001$), o que também ocorreu para os camundongos (ICC = 0,970 / $P = 0,0001$). Para os escores individuais dos membros anterior e posterior, verificou-se a existência de bons níveis de concordância, variando entre “satisfatório” e “excelente” (ICC entre 0,484 e 0,931). O alfa de Cronbach demonstrou ótima consistência para os escores total combinado e total dos membros anterior e posterior, com valores acima de 0,8. Deste modo, concluiu-se que o TEH apresenta boa consistência na análise intra e inter avaliador, sendo o “*foot fault score*” de 7 pontos uma ferramenta confiável para determinar os níveis de adaptabilidade da marcha em ratos e camundongos. Tais achados encorajam a utilização do teste como ferramenta de baixo custo, metodologicamente útil e válida para o estudo da adaptabilidade da marcha em modelos experimentais murinos.

Palavras-chave: Marcha. Caminhada. Camundongos. Ratos.

Abstract

To understand the neurobiological mechanisms that may be involved in gait adaptability is important to develop future rehabilitation strategies for individuals with functional mobility disorders, whether due to neurological diseases or other aging-related conditions. The Ladder Rung Walking Test (LRWT) has been widely used to evaluate normal and pathological gait in murine models, as it allows detailed evaluation of the way the animal places the fore and hindlimbs by a specific score system. However, although it is used in the literature, such test has not yet been adequately validated for its reliability and intra and inter-rater reproducibility. Therefore, the present study aimed to analyze the reproducibility of LRWT, seeking to elucidate its reliability levels. For the study, 40 videos of rodents from the laboratory database (20 videos of Wistar rats and 20 of C57BL / 6 mice, both adults) were used to perform the LRWT. Two independent raters assessed the videos, each video was blindly analyzed twice by the same rater, totalizing 80 analyzes per rater. The agreement scores was tested using the intraclass correlation coefficient (ICC). The results showed that raters I and II obtained excellent agreement for the rats in the combined total score (ICC = 0.961 / $p = 0.0001$), which also occurred for mice (ICC = 0.970 / $P = 0, 0001$). For the individual scores of the fore and hind limbs, good levels of agreement were achieved, ranging from “satisfactory” to “excellent” (ICC between 0.484 and 0.931). Cronbach's alpha showed excellent consistency for total combined score and the total fore and hind limb scores, with values above 0.8. Thus, we concluded that the LRWT has good intra and inter-rater reliability, being the 7-point foot fault score a reliable tool to determine gait adaptability levels in rats and mice. These findings encourage the use of the test as a low-cost, methodologically useful and valid tool for the study of gait adaptability in murine experimental models

Keywords: Gait. Walking. Mice. Rats.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 5 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 7 |
| 2.1 Adaptabilidade da marcha | 7 |
| 2.2 Análise da marcha em roedores | 9 |
| 2.3 Teste da escada horizontal | 11 |
| 3 OBJETIVOS | 13 |
| 3.1 Geral | 13 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 13 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 14 |
| 4.1 Animais | 14 |
| 4.2 Teste da Escada Horizontal | 14 |
| 4.3 Aparato | 15 |
| 4.4 <i>Foot Fault Score</i> | 15 |
| 4.5 Reprodutibilidade Intra e Interavaliadores | 17 |
| 4.6 Comparação entre avaliador experiente e não experiente | 17 |
| 5 ARTIGO CIENTÍFICO | 19 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 45 |
| 7 CONCLUSÃO | 46 |
| REFERÊNCIAS | 47 |
| ANEXOS | 51 |
| ANEXO 1- APROVAÇÕES DAS COMISSÕES CIENTÍFICAS PARA OS PROJETOS ORIGINAIS | 51 |
| ANEXO 2- APROVAÇÕES DO CEUA | 53 |
| ANEXO 3- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO | 55 |

1 INTRODUÇÃO

A adaptabilidade da marcha pode ser definida como uma função sensório-motora complexa, a qual é requerida para controlar e coordenar vários graus de liberdade nas articulações durante a marcha – comportamento que é adaptável, frente a uma variedade de demandas do contexto ambiental que interferem no processo de locomoção (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2014; DUCHARME *et al.*, 2018; HOUDIJK *et al.*, 2012). Nesse contexto, a marcha é direta ou indiretamente influenciada pela integração temporal e espacial de diferentes subsistemas neurais, incluindo os cognitivos e neuromusculoesqueléticos (SHIMADA *et al.*, 2013). Alguns neurocientistas, inclusive, defendem, que o cérebro evoluiu, essencialmente, para que pudéssemos nos mover de forma mais inteligente, avaliando o contexto e fatores relacionados à avaliação de risco e sobrevivência. Nesta óptica, a cognição em si seria um sistema útil para dar sentido ao movimento (GALLIVAN *et al.*, 2018; INGRAM; WOLPERT, 2011; WOLPERT; LANDY, 2012; WOLPERT; DIEDRICHSEN; FLANAGAN, 2011). Além disso, a capacidade de adaptar a marcha de acordo com o contexto ambiental é um aspecto crucial para manter a estabilidade do corpo e evitar quedas (CAETANO *et al.*, 2018; ESTEVES *et al.*, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2018; VAN OOIJEN *et al.*, 2015).

Embora vários estudos tenham focado nos aspectos biomecânicos da capacidade de adaptar a marcha em humanos (DUCHARME *et al.*, 2018; HAWKINS *et al.*, 2017; LANINI *et al.*, 2017;), modelos animais são úteis para fornecer *insights* neurobiológicos em nível celular e molecular (MESTRINER *et al.*, 2013; SOLEMAN *et al.*, 2010; WEARICK-SILVA *et al.*, 2018). Por exemplo, o TEH tem sido usado para avaliar a adaptabilidade da marcha (METZ; WHISHAW, 2002; METZ; WHISHAW, 2009) em lesões isquêmicas unilaterais no córtex motor (ANTONOW- SCHLORKE *et al.*, 2013; SOLEMAN *et al.*, 2010); na lesão medular (GUO *et al.*, 2019; SANDNER *et al.*, 2018); na depleção dopaminérgica induzida por 6-hidroxi-dopamina (um modelo da doença de Parkinson) (FARAJI *et al.*, 2007); na lesão da substância branca neonatal (UED *et al.*, 2018) e em condições relacionadas ao estresse (METZ *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2018; WEARICK-SILVA *et al.*, 2018).

O TEH avalia o sucesso de adaptação da marcha usando medidas de coordenação entre as patas, a base de apoio, a cinemática dos membros anteriores e posteriores, as etapas e ciclos da marcha, a velocidade da marcha e a capacidade

de adaptá-la aplicando um escore de erros na colocação dos membros anteriores e posteriores, chamado de “*foot fault scoring*” (ANTONOW-SCHLORKE *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2019; METZ; WHISHAW, 2002). Tal sistema de pontuação é o mais utilizado na literatura, pois requer apenas uma câmera filmadora manual e a disponibilidade de um pesquisador para gravar e após assistir ao vídeo em velocidade “quadro-por-quadro”, qualificando, assim, os passos do roedor por meio do mencionado escore (METZ; WHISHAW, 2002; WEARICK-SILVA *et al.*, 2018). Esta estratégia de análise pode evitar armadilhas comuns que estão presentes com o uso de marcadores refletivos sob a flexível pele do roedor que, por essa razão, pode elevar os níveis de erro de aferição. Assim, a técnica de avaliação de movimento com o uso de pontos refletivos em roedores tem sido vista com cautela por alguns pesquisadores na área da biomecânica (FILIPE *et al.*, 2006; BAUMAN; CHANG, 2010). Além disso, o TEH permite inferir o grau de sucesso do animal ao adaptar a marcha para evitar quedas e escorregões deflagrados pelo contexto ambiental (MEDEIROS *et al.*, 2018; WEARICK-SILVA *et al.*, 2018).

O sistema de pontuação “*foot fault score*” é uma escala categórica de 7 pontos, na qual a qualidade e a adequação do posicionamento das patas são julgadas, em uma gravação de vídeo quadro a quadro, enquanto os roedores percorrem uma escada horizontal de 1 metro de comprimento. As traves da escada estão dispostas em um padrão que requer do murino a capacidade de adaptar a marcha durante a caminhada (METZ; WHISHAW, 2002; METZ; WHISHAW 2009).

No entanto, o “*foot fault score*” ainda não foi avaliado quanto à sua consistência e reprodutibilidade intra e interavaliador, assim como, não existem dados comparando o desempenho de avaliadores com e sem experiência prévia no teste para analisar a adaptabilidade da marcha com este sistema de pontuação no TEH. De certa forma, a ausência desses dados gera incerteza quanto à confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Os estudos disponíveis até o momento geralmente elegem um único avaliador para analisar todos os vídeos, como uma tentativa de minimizar tal viés, o que é metodologicamente insuficiente à luz da prática científica (SMITH *et al.*, 2008). Desta maneira, o presente estudo foi elaborado para suprir essa carência da literatura, bem como para fornecer informações científicas sobre a validade externa dos achados do TEH em murinos. Ante ao exposto, espera-se que este trabalho possa contribuir para o avanço dos estudos experimentais no campo da neurobiologia da adaptabilidade da marcha.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Adaptabilidade da marcha

A adaptabilidade da marcha é uma função sensório-motora que exige controle e coordenação das articulações para evitar que o contexto ambiental interfira no processo da locomoção (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2014; DUCHARME *et al.*, 2018; HOUDIJK *et al.*, 2012). Esta capacidade de adaptação é o que possibilita caminhar em diferentes circunstâncias, perfis de terrenos e com padrões de velocidades de marcha diferentes (CHOI; BASTIAN, 2007). Nesse contexto, sabe-se que a marcha é direta ou indiretamente influenciada pela integração temporal e espacial de diferentes subsistemas neurais, incluindo cognitivos e neuromusculoesqueléticos (SHIMADA *et al.*, 2013). Além disso, a capacidade de adaptar a marcha de acordo com o contexto ambiental é um aspecto crucial para manter a estabilidade do corpo e evitar a ocorrência de quedas. Sabe-se também que adultos saudáveis modificam parâmetros de passo e passada para atender às demandas da tarefa, o que ocorre em terrenos desiguais ou transições entre diferentes superfícies (VOLOSHINA; KUO; DALEY; FERRIS, 2013). Diversos mecanismos somatossensoriais também auxiliam na adaptabilidade da caminhada, uma vez que a impossibilidade de visualização do trajeto pode afetar o desempenho do controle motor relacionado à tarefa, sendo a visão uma modalidade sensorial muito importante na adaptação da marcha (THIES; RICHARDSON; ASHTON-MILLER, 2005).

A proficiência em adaptar a marcha parece mudar com o decorrer da idade. Bruijn e colaboradores (2012), em seu estudo comparando a adaptabilidade da marcha de adultos e idosos, verificou que o grupo mais velho foi menos capaz de mudar seus tempos relativos da fase de balanço, no ciclo de marcha (BRUIJN *et al.*, 2012). O aumento da variabilidade do tempo, largura e comprimento do passo, também influenciam na marcha do idoso e são considerados fatores preditores de quedas (BEAUCHET *et al.*, 2008). Além disso, acredita-se que a atrofia muscular e a disfunção/degeneração de neurônios dopaminérgicos também contribuam, em parte, para gerar alterações na modulação da marcha no idoso (KENNEDY; RAZ, 2005; KAASINEN; RINNE, 2002). Outrossim, perdas graduais da capacidade visual e proprioceptiva, que estão intimamente relacionadas com o envelhecimento, também

contribuem para a diminuição do equilíbrio durante a marcha – fatores que contribuem para a elevação da frequência de quedas. (MENZ; LORD; FITZPATRICK, 2003).

Para evitar a instabilidade durante a marcha, muitos idosos usam estratégias motoras adaptativas de equilíbrio dinâmico (CROMWELL *et al.*, 2004), como por exemplo, adotar uma marcha mais estável com o emprego de uma maior quantidade de passos para uma dada distância, quando comparados com jovens adultos. Porém, em condições mais desafiadoras, a adaptabilidade da marcha é fundamental para qualquer faixa etária (ROGERS; CROMWELL; GRADY, 2008). Ainda, um estudo observou que crianças com até 11 anos de idade apresentavam taxas mais lentas de adaptação dos parâmetros espaciais da marcha quando comparados com adultos que sofreram danos cerebelares (VASUDEVAN *et al.*, 2011). Tal fato é deveras interessante e contribui para que os estudos nesta área sigam avançando para melhor compreensão dos mecanismos neurobiológicos envolvidos na adaptação da locomoção.

Embora o controle dos mecanismos básicos da marcha seja automatizado, alguns estudos sugerem que as funções executivas/cognitivas talvez sejam fatores determinantes para explicar a capacidade de adaptação da marcha frente ao seu contexto de execução (YOGEV-SELIGMANN; HAUSDORFF; GILADI, 2008; HAUSDORFF *et al.*, 2008). Foi observado que tarefas que exigem um alto nível de controle motor envolvem também funções cognitivas para produzir respostas motoras complexas, que são moduladas a partir de múltiplas entradas sensoriais e restrições ambientais (BEAUCHET *et al.*, 2008). Evidências indicam que não somente o cerebelo é recrutado durante a marcha, sendo necessária uma rede sensório-motora ampla e complexa para aprender um ajuste de caminhada ou manter a estabilidade dinâmica durante uma tarefa de locomoção em contexto variável (HOFFLAND *et al.*, 2014). Annweiler *et al.* (2013), associaram uma menor velocidade da marcha em dupla tarefa cognitivo-motora com a diminuição de volume do córtex motor em idosos. Adicionalmente, um estudo utilizando ressonância magnética funcional observou a ativação de uma rede cerebral compreendendo o córtex motor suplementar, bilateralmente (área que recebe diversas informações de outras regiões cerebrais), o córtex motor primário, córtex pré-frontal direito e cerebelo, durante o desempenho da marcha de jovens saudáveis e idosos (ALLALI *et al.*, 2013). Por fim, muito recentemente, um estudo de uma coorte de cinco décadas (904 indivíduos) revelou que a velocidade da marcha na idade madura (por volta dos 45 anos) era capaz de

predizer a taxa de envelhecimento cerebral e cognitivo dos participantes (RASMUSSEN *et al.*, 2019).

Destaca-se também que o contexto psicológico/carga emocional talvez possa interferir na forma como as adaptações da marcha acontecem frente às mais diversas situações ambientais. Por exemplo, observou-se que roedores que passaram por um evento aversivo que induziu a formação de uma memória aversiva resistente a extinção, alteraram a capacidade de adaptação da marcha (MEDEIROS *et al.*, 2018). Sendo assim, é crucial dispor de métodos comportamentais validados e confiáveis para que este campo de investigação neurobiológica possa continuar sendo investigado.

2.2 Análise da marcha em roedores

Embora humanos e primatas exibam uma ampla diversidade de movimentos hábeis, os modelos murinos são uma excelente opção quando desejamos estudar alguns dos mecanismos neurobiológicos que ocorrem durante a adaptação e o aprendizado de movimentos. Roedores têm sido amplamente utilizados na pesquisa para entender e compreender aspectos da fisiologia, fisiopatologia e potenciais tratamentos pré-clínicos. Entretanto, embora camundongos e ratos pertençam a mesma família, compartilhando muitas características ancestrais importantes, existem diferenças entre eles que impactam na escolha do modelo para os estudos em neurociência e controle motor (ELLENBROEK; YOUN, 2016). Evidências indicam que a impulsividade, que é a tendência de agir sem um planejamento, está aumentada no rato e pode influenciar o seu comportamento e aprendizagem cognitivo-motora. Porém, acredita-se que, a longo prazo, o camundongo tenha mais dificuldades na adaptação à alguns aparatos comportamentais, exigindo mais treinamento e/ou adaptação do que o rato (YOUNG *et al.*, 2013; PARKER *et al.*, 2014). Contudo, tais generalizações precisam ser vistas com cautela, já que cada linhagem específica possui suas próprias características.

O aprendizado de habilidades motoras bem-sucedidas requer treinamento repetitivo e intercalado por períodos de descanso. Enquanto habilidades complexas exigem um protocolo de treino de alguns dias para que ocorra uma adaptação, tarefas mais simples podem ser aprendidas em poucas horas ou menos (BUITRAGO *et al.*, 2004). Um grande número estudos foram desenvolvidos com o intuito de compreender

os déficits motores relacionados a locomoção por meio de avaliações quantitativas e qualitativas capazes de fornecerem informações sobre uma habilidade motora específica (MENDES *et al.*, 2015). Wallace e colaboradores foram um dos primeiros pesquisadores que observaram déficits motores progressivos relacionados a idade em roedores (WALLACE *et al.*, 1980). Neste estudo, ratos de 6, 12, 18 e 24 meses foram testados em plataforma elevada, preensão em um fio horizontal suspenso e o teste do rotarod, tarefas essas que exigem um controle coordenado de respostas motoras (WALLACE *et al.*, 1980). Outro estudo verificou um desempenho reduzido na velocidade e distância percorrida no teste da roda estacionária durante um período de 4, 6 e 8 meses em um modelo murino da doença de Huntington (HICKEY *et al.*, 2008).

Para análises específicas da biomecânica da marcha é possível utilizar marcadores refletivos nas articulações. Leblond *et al* (2003) determinaram as características e os padrões cinemáticos da marcha de camundongos saudáveis em esteira por meio de eletromiografia e análise biomecânica, contendo a duração média do ciclo do passo, fase de apoio e fase de balanço. Além disso, no mesmo estudo foi investigado o tipo de padrão de marcha adotado por roedores após uma lesão medular completa e comparado com os animais saudáveis. Contudo, os métodos cinemáticos com o uso de marcadores possuem limitações relacionadas à mobilidade da pele do animal, o que eleva muito o erro de aferição (MENDES *et al.*, 2015). Outra alternativa frequentemente utilizada para avaliar a caminhada de roedores é a pintura das patas – conhecido como “teste da marca das patas”. Neste teste, o padrão de pisada/pegada do animal é definido pelas manchas deixadas em folha de papel em branco (CARTER *et al.*, 1999). Esses padrões podem ser analisados posteriormente para fornecer informações de vários parâmetros estáticos do passo, incluindo comprimento da passada, apoio das patas ou extensão da pisada (MENDES *et al.*, 2015). No entanto, este teste não fornece parâmetros dinâmicos de locomoção, como a duração das etapas do ciclo da marcha ou a coordenação entre membros. Tais parâmetros podem ser adquiridos por meio da gravação de vídeos dos roedores enquanto eles caminham sobre uma superfície de fácil visualização, transparente, seguida de uma análise quadro a quadro do vídeo obtido. Contudo, tal análise fornece apenas parâmetros descritivos da marcha cíclica usual em terreno plano e sem desníveis. Portanto, tais avaliações não fornecem muitas informações em relação à adaptabilidade da marcha (MENDES *et al.*, 2015).

Apesar de muitos estudos terem focado na questão biomecânica da marcha (DUCHARME *et al.*, 2018; HAWKINS *et al.*, 2017; LANINI *et al.*, 2017), os modelos animais têm sido úteis para fornecer *insights* neurobiológicos entre o comportamento e alguns mecanismos celulares e moleculares (MESTRINER *et al.*, 2013; SOLEMAN *et al.*, 2010; WEARICK-SILVA *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2016). Por exemplo, o TEH tem sido usado para avaliar a adaptabilidade da marcha (METZ; WHISHAW, 2002; METZ; WHISHAW, 2009) em lesões isquêmicas unilaterais no córtex motor (ANTONOW-SCHLORKE *et al.*, 2013; SOLEMAN *et al.*, 2010) lesão medular (GUO *et al.*, 2019; SANDNER *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2016); depleção dopaminérgica induzida por 6-hidroxidopamina (um modelo da doença de Parkinson) (FARAJI *et al.*, 2007) lesão da substância branca neonatal (UED *et al.*, 2018) e condições relacionadas ao estresse (METZ *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2018; WEARICK-SILVA *et al.*, 2018). Além disso, Merret, Kirkland e Metz (2010) observaram que animais adultos e idosos apresentam todos os comportamentos quantificáveis pelo “*foot fault score*”, diferindo, apenas, quanto à frequência das classes de erros - uma vez que os animais mais velhos cometem mais erros em comparação com os adultos. Assim, com o uso de modelos murinos, é possível estabelecer relações entre a adaptabilidade da marcha e os mecanismos neurológicos adjacentes (WEARICK-SILVA *et al.*, 2018).

2.3 Teste da escada horizontal

O TEH, descrito por Metz e Whishaw em 2002, permite avaliar a caminhada e medir especificamente a colocação do membro anterior e posterior do roedor a cada ciclo da marcha. Neste teste, os roedores andam espontaneamente do local inicial do teste (início da escada) até uma meta pré-estabelecida (final do percurso da escada), sendo que o comportamento é filmado para posterior análise. Os animais passam por um momento de adaptação ao aparato, porém os espaçamentos entre as traves são variáveis e devem ser alternados para impedir que o trajeto seja aprendido e facilite o desempenho do animal no teste (METZ; WISHAW 2002; METZ; WISHAW 2009).

O TEH possibilita avaliar o padrão de caminhada usando medidas de coordenação entre os pés, apoio para os pés, cinemática dos membros anteriores e posteriores, etapas e ciclos da marcha, velocidade da marcha e a capacidade de adaptar a marcha aplicando um escore descrito por Metz, o “*foot fault score*”

(ANTONOW-SCHLORKE *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2019). Este sistema requer apenas uma câmera manual e um pesquisador para assistir ao vídeo e qualificar as etapas usando uma pontuação padronizada (METZ; WHISHAW, 2002; WEARICK-SILVA *et al.*, 2018). Testes utilizando um aparato similar avaliaram o equilíbrio dinâmico dos roedores durante um dado trajeto, porém, se tratando da adaptabilidade da marcha, sua forma de análise não é tão eficiente e específica quanto o sistema de pontuação desenvolvido por Metz e Whishaw (CUMMINGS *et al.*, 2007).

O sistema de pontuação que avalia a qualidade da pisada/pegada – o “*foot fault score*” - é uma escala de 7 pontos na qual a qualidade e a adequação do posicionamento da pata são julgadas, quadro a quadro, em uma gravação de vídeo dos roedores percorrendo uma escada horizontal de 1 metro de comprimento. As travessias estão dispostas em um padrão que requer do roedor a capacidade de adaptar a marcha durante a caminhada para evitar escorregões e quedas (METZ; WHISHAW, 2002; METZ; WHISHAW, 2009). No entanto, que seja de nosso conhecimento, o TEH ainda não foi avaliado quanto à sua reprodutibilidade inter e intra-avaliador, o que gera incerteza quanto à confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Além disso, não existem dados comparando o desempenho entre avaliadores treinados e não treinados no *foot fault score* do TEH. Tendo em vista esta lacuna na literatura, os estudos disponíveis tipicamente elegem um único avaliador para o TEH, em uma tentativa de minimizar erros de aferição. Ante ao exposto, o presente estudo foi elaborado com o intuito de fornecer informações científicas sobre a reprodutibilidade do TEH, de modo a contribuir para o avanço dos estudos sobre a adaptabilidade da marcha empregando modelos murinos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a consistência e a reprodutibilidade do teste da escada horizontal, buscando elucidar os seus níveis de confiabilidade.

3.2 Objetivos Específicos

- Testar uma adaptação do aparato do Teste da Escada Horizontal para camundongos.
- Avaliar a reprodutibilidade intra- e interavaliador dos escores do TEH em ratos e camundongos.
- Avaliar a consistência dos escores do TEH em ratos e camundongos.
- Comparar a reprodutibilidade do TEH em ratos e camundongos obtida por avaliadores com e sem experiência prévia com o teste.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização do presente estudo, empregou-se 40 vídeos de murinos adultos saudáveis realizando o teste da escada horizontal. Os vídeos de animais controles foram obtidos de um banco de dados do laboratório (20 vídeos de ratos Wistar machos e 20 de camundongos C57BL/6 machos), visando substituir o uso desnecessário de novos animais para esta pesquisa. Os experimentos originais foram realizados no primeiro semestre de 2016 para os ratos e primeiro semestre de 2017 para os camundongos, os animais foram obtidos do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Foram alojados em caixas padrão, conforme rotina do biotério e mantidos com acesso livre à água e comida, sob um ciclo de 12 horas claro/escuro, e temperatura entre 22 e 24°C. Todos os procedimentos estiveram de acordo com Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (Concea) e foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da PUCRS, sob os números de protocolo 15/00442 e 15/00475.

4.2 Teste da Escada Horizontal

O Teste da Escada Horizontal é uma ferramenta que permite avaliar e classificar a capacidade de adaptação da marcha, com ênfase na função dos membros anteriores e posteriores (METZ; WHISHAW, 2009). Os animais são colocados no início da escada e, em seguida, atravessam o aparato, adaptando sua marcha por meio do apoio das patas nas barras disponíveis, até alcançar sua caixa moradia (Figura 1). Antes de serem avaliados, os roedores são expostos a dois trails de habituação e treinamento. No primeiro trail todas as barras estão preenchidas em um padrão simétrico e no segundo trail a distribuição das barras é assimétrica. Durante a execução da tarefa, os roedores foram filmados com uma câmera GoPro Hero 4, 12Mp, com uma taxa de aquisição de 240 *frames* por segundo (FPS), em uma vista lateral, permitindo a análise de vídeo *post-hoc*, quadro a quadro.

4.3 Aparato

O aparato é constituído por paredes laterais de acrílico transparente (100 cm de comprimento) e degraus de metal com 3 mm de diâmetro para ratos e 2 mm para camundongos, com uma distância mínima de 1 cm entre as barras (para os ratos) e 0,5 cm (para os camundongos). As paredes de acrílico medem 20 cm de altura e o aparato da escada horizontal é elevado 30 cm acima do solo. Caixas moradia padrão são posicionadas no início e no final da escada (Figura 1). Destaca-se que a caixa padrão inicial serve, apenas, como um suporte para o aparato ficar elevado do chão e nivelado – uma vez que o pesquisador coloca o animal diretamente na entrada da escada horizontal para iniciar o teste. As dimensões para os ratos foram as mesmas estabelecidas por Metz e Whishaw, em 2002 e para camundongos foi adotado o padrão Farr *et al* em 2006. Em relação ao tamanho do animal (rato ou camundongo), a largura do espaço no interior da escada foi ajustada visando impedir que o roedor se virasse durante o teste, mudando, assim, o sentido de seu deslocamento (METZ; WHISHAW, 2002; FARR *et al.*, 2006; WEARICK-SILVA *et al.*, 2018).

O padrão em que as barras de aço inoxidável são distribuídas ao longo do aparato modifica a tarefa e pode aumentar ou reduzir a sua dificuldade. Assim, um arranjo regular permite que os animais aprendam a posição das barras durante as sessões de treinamento e possam antecipar a previsibilidade de suas posições (traves tipicamente espaçadas em intervalos de 1 a 2 cm) (Figura 1, Padrão Simétrico). Já nos padrões de distribuição irregular, as barras são modificadas aleatoriamente em cada tentativa/trial para impedir que os roedores aprendam a sequência de disposição das barras. Tal arranjo é mais útil para a avaliação da capacidade de adaptação da marcha. Assim, a distância das traves varia entre 1 e 5 cm para ratos e 0,5 a 2,5 cm para camundongos (Figura 1: Padrão Assimétrico) (METZ; WHISHAW, 2002; MEDEIROS *et al.*, 2018; WEARICK-SILVA *et al.*, 2018). Todos os vídeos analisados neste estudo utilizaram arranjos assimétricos randômicos para a disposição das traves do teste.

4.4 Foot Fault Score

Para avaliar a colocação dos membros anteriores e posteriores nas traves de metal do TEH, o que exige posicionamento preciso e coordenado da pata, passada e

coordenação inter-límbica, um escore quantitativo pode ser obtido a partir de uma análise qualitativa. O *foot fault score* foi descrito pela primeira vez por Metz e Whishaw em 2002. Tais autores criaram um sistema de pontuação que acompanha passo a passo, para cada membro, por meio da análise de gravação de vídeos no modo quadro a quadro. O escore usa uma escala de 7 categorias para classificar o posicionamento da pata de acordo com a sua posição e os erros cometidos ao colocar as patas nas traves do aparato.

Em relação à pontuação, atribui-se a nota 0 (**Total miss**) quando o membro não toca na trave e resulta em queda. Portanto, neste caso, a queda ocorre quando um ou mais membros caem entre as traves e a postura e equilíbrio do animal são perdidos. O escore 1 (**Deep Slip**) é atribuído quando o membro escorrega de uma trave, ocorrendo uma queda. O escore (2) (**Slight Slip**) ocorre quando o membro escorrega de uma trave enquanto o animal realiza a descarga de peso corporal sobre ela. Contudo, neste caso, o animal organiza o seu equilíbrio e previne a queda interrompendo a marcha. Já a pontuação 3 (**Replacement**) é dada quando, antes de realizar a completa descarga de peso do membro em uma dada trave, o roedor levanta rapidamente o membro e recoloca a pata em outra trave, fazendo uma recolocação da pata. Já na pontuação 4 (**Correction**), o membro desloca-se em direção de uma dada trave, mas altera a direção do movimento para outra trave, antes de ocorrer o toque na primeira. O escore 5 (**Partial Placement**) é dado quando o animal coloca o membro em uma trave utilizando-se do punho ou dos dedos do membro anterior ou, ainda, o calcanhar ou um dos dedos do membro posterior. Finalmente, o escore 6 (**Correct Placement**) é atribuído quando o animal posiciona a porção média do ventre palmar ou plantar da pata em uma trave, realizando a descarga do peso corporal (METZ, WHISHAW, 2002; METZ; WHISHAW, 2009).

Neste estudo, foi atribuída uma pontuação para o membro anterior e para o membro posterior de forma independente, de acordo com as categorias mostradas na Tabela 1. Alguns autores sugerem que apenas uma nota representativa de cada passada deve ser dada, considerando o escore mais baixo. Contudo, tal abordagem dificulta o estudo dos membros em separado. Para a determinação do escore de desempenho, a pontuação atribuída em cada categoria é multiplicada pela sua frequência de ocorrências no teste. Na sequência, a pontuação total de cada membro é obtida pela soma dos valores obtidos em cada uma das categorias para o membro

em questão. Por fim, a soma dos escores do membro anterior e posterior constituem a pontuação total do TEH, normalizada pelo número de passos que o animal executou durante o teste. O protocolo e os detalhes técnicos para o uso do *foot fault score* foram publicados anteriormente por Metz e Wishaw (2009).

Neste estudo, avaliamos as seguintes variáveis do TEH quanto à concordância Intra e interavaliador: a) tempo total de travessia; b) número de paradas no teste; c) tempo total de parada; d) escores de 0 a 6 para o membro anterior; e) escore total para o membro anterior; f) escores 0 a 6 para colocação dos membros posteriores; g) pontuação total dos membros posteriores e h) pontuação total combinada dos membros.

4.5 Reprodutibilidade Intra e Interavaliadores

Para avaliar a reprodutibilidade intra e interavaliador, dois pesquisadores independentes e alheios à origem do material experimental (chamados avaliador A e B) analisaram 20 vídeos de ratos e 20 de camundongos realizando o TEH. Cada registro foi analisado duas vezes pelo mesmo avaliador, que não sabia deste fator de repetição, totalizando 80 análises para cada um dos avaliadores. Os vídeos foram nomeados aleatoriamente por outro pesquisador independente (não envolvido na análise dos dados) para reduzir o risco de identificação do material. Assim, cada vídeo tinha um código de registro diferente, garantindo uma análise às cegas.

4.6 Comparação entre avaliador experiente e não experiente

Dentre os pesquisadores eleitos para realizar a análise dos vídeos, o avaliador II já tinha experiência prévia de 2 anos. Já o avaliador I, não tinha experiência prévia com o teste e, assim, recebeu um treinamento supervisionado antes da realização das análises. Este treinamento consistiu no estudo dos artigos originais de Metz e Wishaw de 2002 e 2009 – publicações que versam sobre o teste e a aplicação do *foot fault score*. Além disso, o avaliador I analisou alguns vídeos do teste (não incluídos neste estudo) sob a supervisão de um pesquisador experiente, quando teve a oportunidade de dirimir dúvidas e discutir detalhes da metodologia de análise empregada. Somente após este treinamento supervisionado é que a coleta de dados do presente estudo foi

iniciada. Importante, ainda, mencionar que o avaliador I foi orientado à não procurar auxílio com outros pesquisadores depois que a fase de coleta de dados foi iniciada.

4.7 Análise Estatística

O coeficiente de correlação intraclassa (ICC) e o coeficiente Kappa foram empregados para verificar a precisão da concordância intra e interavaliador e a consistência na análise dos desfechos estudados. Valores de concordância no ICC superiores a 0,75 foram considerados "excelentes"; entre 0,4 e 0,75 "satisfatório" e aqueles <0,4 foram considerados "ruins". Quando ocorreram valores ICC negativos (diferença entre valores maiores que a variação da amostra), os dados foram substituídos por zero, conforme recomendado por Bartko (1976), Shrout e Fleiss (1979). Valores de alfa de Cronbach acima de 0,7 foram considerados consistentes. O nível de significância $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Dados de reprodutibilidade foram expressos como média e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Cabe destacar que o tamanho amostral de 20 vídeos é suficiente para análises de concordância do tipo "teste-reteste", uma vez que, a partir deste tamanho amostral, as médias dos ICCs tendem a permanecer estáveis e sem diferença estatisticamente significativa (SANTOS *et al.*, 2018). A análise estatística foi realizada no software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 20.0.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados da presente dissertação serão apresentados na forma de artigo científico. O manuscrito em questão foi submetido ao periódico “*Journal of the Experimental Analysis of Behavior*”, classificado A2, conforme os critérios do novo Qualis-CAPES.

5.1 Comprovante da submissão


Journal of the Experimental Analysis of Behavior

🏠 Home

✍️ Author

🗨️ Review

Submission Confirmation

🖨️ Print

Thank you for your submission

| | |
|-----------------------|--|
| Submitted to | Journal of the Experimental Analysis of Behavior |
| Manuscript ID | JEAB-2020-0035 |
| Title | The ladder rung walking test: a reliable method to study walking adaptability in rodents |
| Authors | Martins, Lucas Schiavo, Aniuska Xavier, Léder Mestriner, Régis |
| Date Submitted | 08-Apr-2020 |

5.2 Artigo Científico

The ladder rung walking test: a reliable method to study walking adaptability in rodents

Ladder rung walking test reliability

Lucas Athaydes Martins^{1,2†}, Aniuska Schiavo^{1,2†}, Léder Leal Xavier^{2,3},
Régis Gemerasca Mestriner^{1,2,3*}

¹ Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, PUCRS. Graduate Program in Biomedical Gerontology, School of Medicine, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Neurorehabilitation and Neural Repair Research Group (NEUROPLAR). Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³School of Health and Life Sciences. Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

† These authors contributed equally to this work.

***†Corresponding Author:**

Régis Gemerasca Mestriner, PhD
e-mail: regis.mestriner@pucrs.br
Address: Av. Ipiranga, 6681 – Building 12 / Room:104.
ZIP-code: 90619-900. Porto Alegre – RS, Brazil.
Phone: +55 51 33536031.
ResearchID: A-5911-2015.
ORCID: orcid.org/0000-0001-9837-1691

ABSTRACT

The ladder rung walking test (LRWT) is used to assess walking adaptability in rodents. However, the reliability of the LRWT foot fault score has not been properly investigated. This study was designed to address this issue. Two independent and blinded raters analyzed 20 rat and 20 mice videos. Each video was analyzed twice by the same rater (80 analyses per rater). The intraclass correlation coefficient (ICC) and the Kappa coefficient were employed to check the accuracy of agreement and reliability in the intra- and inter-rater analyses of the LRWT outcomes. Excellent intra- and inter-rater agreement was found for the forelimb, hindlimb and both limbs combined in rats and mice. The agreement level was also excellent for total crossing time, total time stopped and number of stops during the walking path. Rating individual scores in the foot fault score system (0 to 6) ranged from satisfactory to excellent, in terms of the intraclass correlation indexes. Moreover, we showed experienced and inexperienced raters can obtain reliable results if supervised training is provided. We conclude the LRWT is a reliable and useful tool to study walking adaptability in rodents and can help researchers address walking-related neurobiological questions.

Key Words: Walking, Locomotion, Rodentia, Reliability

INTRODUCTION

Walking adaptability can be defined as a complex sensory-motor function, qualified or required to control and coordinate various degrees of freedom in joints, in a variety of environmental contexts, or that interfere with locomotion (Ducharme et al., 2018; Balasubramanian et al., 2014; Houdijk et al., 2012). Gait is influenced by the temporal and spatial integration of the cognitive and neuromusculoskeletal neural systems (Shimada et al., 2013). Moreover, the ability to adapt gait according to environmental context is a crucial aspect in maintaining body stability and preventing falls (Medeiros et al., 2018; Caetano et al., 2018; Esteves et al., 2016; Van Ooijen et al., 2015).

Whilst several studies into walking adaptability have focused on human biomechanics (Hawkins et al., 2017; Lanini et al., 2017; Ducharme et al., 2018), animal models can usefully provide neurobiological insights at the cellular and molecular level (Soleman S et al., 2010; Wearick-Silva et al., 2018; Mestriner et al., 2013). For instance, the Ladder Rung Walking Test (LRWT) has been used to assess walking adaptability (Metz & Whishaw, 2002; 2009) in unilateral ischemic injury in the motor cortex (Soleman et al., 2010; Antonow-Schlorke et al., 2013); spinal cord injury (Sandner, 2018; Guo et al., 2019); dopaminergic depletion induced by 6-hydroxydopamine (a model of Parkinson's disease) (Faraji et al., 2007); neonatal white matter injury (Ued et al., 2018) and stress-related conditions (Metz et al., 2015; Medeiros et al., 2018; Wearick-Silva et al., 2018).

The LRWT can assess walking patterns by using measures of inter-foot coordination, foot support, fore and hindlimb kinematics, step and gait cycles, gait speed, and the ability to adapt walking by applying a foot-fault score (Antonow-Schlorke et al., 2013; Guo et al., 2019). The test provides measures of gait adaptability with emphasis in forelimb and hindlimb function by applying the foot-fault score (Metz & Whishaw, 2009). The foot-fault score system is widely used in the literature since it requires only a hand camera and a minimally trained researcher to analyze the video and apply the foot-fault score (Metz & Whishaw, 2002; Wearick-Silva et al., 2018). This method may avoid common pitfalls that occur when using reflective markers on the flexible skin of rodents (Filipe et al., 2006; Bauman & Chang, 2010) and gives a measure of the success in adapting walking (Medeiros et al., 2018; Wearick-Silva et al., 2018).

The foot-fault score system is a 7-point category scale in which the quality and appropriateness of foot placement is judged by analyzing a video recording, frame-by-frame, of rodents walking along a 1-meter long horizontal ladder. The rungs are arranged in a pattern

that requires murine ability to adapt walking (Metz & Wishaw, 2002; 2009). However, to the best of our knowledge, this test has not been properly assessed regarding its intra-rater and inter-rater reliability and reproducibility, which is a source of uncertainty. Current studies usually elect a single rater to analyze all videos in an attempt to minimize bias, which is scientifically insufficient. The present study sought to provide scientific information regarding the external validity of the LRWT findings in rodents, thus contributing to advancements in the field of neurobiology of walking adaptability.

MATERIALS AND METHODS

We used 40 video recordings of healthy rodents from our lab database (20 recordings of Wistar CriCembe:WI rats and 20 of C57BL/6JUnib mice), that performed the horizontal ladder rung walking test. At the time of the original experiments, the animals were provided by the Center for Experimental Biological Models (CeMBE) of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul. The animals were housed in cages each containing three to four rodents on a 12-hour dark-light cycle with food and water available *ad libitum*, at a temperature of 22 to 24 °C. The experiments were carried out in accordance with the National Council for Animal Control and Experimentation (Concea) and all the procedures were approved by the University Animal Ethics Commission (CEUA) under protocol numbers 15/00442 and 15/00475.

Ladder rung walking test

We used two LRWT apparatus, one for rats and another adapted for mice. Both consisted clear Plexiglas side walls (100 cm long and 20 cm high). The diameter of the metal rungs varied, being 3 mm for rats and 2 mm for mice. The minimum and maximum gaps between the rungs also varied, being from 1 to 5 cm for rats and from 0.5 to 2.5 cm for mice. In both cases, the ladders were elevated horizontally 30 cm above the ground, with a neutral cage placed in the starting position and the animal's home cage placed at the opposite end of the ladder (Figure 1). The between-wall distance was adjusted leaving 1 cm wider than the size of rodent to prevent the animal turning around during the crossing (Metz & Wishaw, 2002; Farr et al., 2006; Wearick-Silva et al., 2018).

The pattern of the metal rungs demands different degrees of walking adaptability and can be used to vary the complexity of the test. A regular arrangement allows animals to learn the position of the rungs over training sessions and to anticipate limb placement (Figure. 1,

Symmetrical Pattern). In irregular patterns, rungs are randomly repositioned in each trial to prevent the rodents learning the rung sequence. Thus, irregular patterns are more useful when studying walking adaptability (Figure. 1, Asymmetrical Pattern) (Metz & Whishaw, 2002; Medeiros et al., 2018; Wearick-Silva et al., 2018). In this study, only irregular rung patterns were analyzed.

In the test, the animals were placed at the beginning of the ladder, walked along it, adapting their foot placement on the rungs until reaching the home cage (Figure 1). While performing the test, we filmed the rodents using a camera (GoPro Hero 4, 12 megapixels). An acquisition rate of 240 frames per second (FPS) in a lateral view was adopted allowing a *post-hoc* frame-by-frame video analysis.

----- Figure 1 here -----

Foot Fault Scoring System

To assess the fore and hindlimb placement on the rungs, which requires precise and coordinated foot positioning as well as stride and inter-limbic coordination a quantitative foot fault scoring system (Metz & Whishaw, 2002) derived from a categorical analysis was used. In the system, a frame-by-frame video recording analysis is performed to identify the steps in each limb and qualify foot placement using a 7-point category scale (Metz & Whishaw, 2009; 2002) (Table 1). The score 0 is given when the limb did not touch the rung (missed a rung) and resulted in a fall (total miss). A fall is considered when the limbs fell between rungs and the animal's posture and balance are disturbed. Score 1 is given when the limb slipped off a rung and a fall occurred (deep slip). Score 2 is given when the limb slipped off a rung during weight bearing, but a fall did not occur and the rodent interrupts walking (slight slip). Score 3 is given when, before weight bearing the limb on a rung, the rodent quickly lifted and placed the foot on another rung (replacement). Score 4 occurs when the limb is clearly about to be placed on a rung, but the rodent quickly changes the feet placement to another rung without touching the first rung (correction). Score 4 is also given when the limb is placed on a rung, but the animal removes the foot and repositions it on the same rung. Score 5 is given when the limb is placed on the rung either using the wrist or digits for the forelimb or heel or toes for the hindlimb (partial placement). Finally, score 6 is given when the full body weight bearing is applied on a rung with the midportion of the foot (correct placement) (Table 1).

----- Table 1 here -----

The score given in each category is then multiplied by the frequency of foot placements in the same category. Afterwards, the sum of all the categories provides the total combined score (sum of the forelimb plus the hindlimb scores). The fully explained video protocol and all technical details to apply the foot fault score were previously published by Metz & Whishaw (2009).

In this study the following outcomes in the LRWT were assessed for inter-rater and intra-rater agreement: Total Crossing Time, Number of Stops, Total Time Stopped, Scores 0 to 6 for forelimb, Total Score for forelimb, Scores 0 to 6 for hindlimb, Total Score of hindlimb and the Combined Total Score of limbs.

The skilled walking performance score (SWPS) was represented as a percentage of the maximum possible performance (100%) (Medeiros et al., 2018; Altamentova et al., 2020). The number of cycles (NC) each rodent took to cross the ladder was multiplied by 6 (the maximum score for each cycle in the foot fault score system) and the resulting number was considered the maximum possible performance of each animal in a trial (100%). Then, during a trial, each cycle was rated according to the foot fault score system and the sum of the obtained scores provided the total score in the trial (TS). Finally, the SWPS was represented as a percentage of the maximum possible performance (100%) (Medeiros et al., 2018; Altamentova et al., 2020), as follows:

$$SWPS = \frac{(TS * 100)}{(NC * 6)}, \text{ where:}$$

SWPS = skilled walking performance score

TS = total score in the trial

NC: number of cycles

6: maximum score for each cycle in the foot fault score system

Foot placement reliability between inter- and intra-rater

In order to assess inter- and intra-rater reliability, two independent and blinded raters (called I and II) analyzed 20 rat and 20 mice videos. Each video was analyzed twice by the same rater (80 analyses per rater). The videos were named randomly by another independent researcher (not involved in the analyses) to prevent raters I and II from perceiving half of the videos were the same. Thus, each video had a different number to ensure a blinded reproducibility analysis. Rater I (Schiavo, A) was inexperienced in the foot fault score and received supervised training before starting data collection. Rater II (Martins, LA) had

previous experience and publications using the LRWT (Medeiros et al., 2018; Wearick-Silva et al., 2018).

Statistical Analysis

The intraclass correlation coefficient (ICC) and the Kappa coefficient were employed to verify the accuracy of agreement and reliability in the inter-rater and intra-rater analyses of the foot fault scores. Agreement values in ICC greater than 0.75 were considered "excellent"; between 0.4 and 0.75 "satisfactory" and those <0.4 were considered "poor". When negative ICC values (difference between values greater than sample variance) occurred, the data were replaced by zero, as recommended by Bartko (1976), Shrout and Fleiss (1979). The statistical analysis was performed using the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 20.0.

RESULTS

Inter-rater reliability for rat

The LRWT analyses in rat demonstrated rater I and II achieved an excellent agreement in the combined total score of limbs (ICC=0.938/ $p=0.0001$). Regarding all the timed outcomes, the total crossing time (ICC=0.994/ $p=0.0001$) and the total time stopped (ICC=0.992/ $p=0.0001$) agreement levels were considered excellent, as were the variable number of stops (ICC=0.957/ $p=0.0001$). Thus, the reliability between the total score for forelimb and hindlimb placement was shown to be excellent.

Furthermore, we analyzed the reliability among all scores described in the test, specifically, in the categories 0 to 6 for each of the limbs evaluated. For the forelimb, the data showed an excellent reliability in scores 0, 1 and 2, varying from ICC 0.839 to 1 ($p=0.0001$) as well as for scores 5 and 6 (ICC 0.813 and 0.854, respectively / $p=0.0001$). However, for the forelimb scores 3 and 4, the raters obtained a satisfactory agreement (ICC 0.721 and 0.551, respectively / $p\leq 0.045$). Similarly, for the hindlimb excellent reliability was obtained for scores 0, 1, 3 and 4, with the ICC ranging from 0.889 to 0.931 ($p=0.0001$). The reliability for scores 2, 5 and 6 was also considered satisfactory (Table 2).

The individual results for each animal in relation to SWPS are shown in Figure 2. In addition, the frequency of each score (1 to 6) for hindlimb and forelimb of each rodent is shown in Figure 4.

----- Table 2 here -----

Inter-rater reliability for mice

The inter-rater reliability score system for mice is shown in Table 3. We observed a strong agreement between the raters in the combined total score (ICC=0.954/P=0.0001), total crossing time (ICC=1/P=0.0001), number of steps (ICC=0.922/P=0.0001) and total time stopped (ICC=0.998/P=0.0001). In addition, the forelimb and hindlimb placement scores showed excellent agreement in the LRWT, with less consistency for forelimb placement (score 3) (ICC=0.466/P=0.090) and hindlimb correction (score 4) (ICC=0.484/p=0.079). Overall, the total scores for the forelimb (ICC=0.925/p=0.0001) and hindlimb (ICC=0.919/p=0.0001) placement between raters I and II showed strong agreement.

----- Table 3 here -----

Intra-rater reliability for rat

Table 4 shows the intra-rater analyses in rat. We found excellent agreement in the combined total score, total crossing time, number of stops and total time stopped for both raters. Regarding score evaluation, rater I obtained excellent agreement in all the scores for the forelimb (ICC between 0.899 to 0.989 / p=0.0001). Rater II achieved excellent agreement in all scores for forelimb (ICC between 0.787 to 0.920), except for score 6, which was considered satisfactory (ICC=0.652 / p=0.13).

In relation to hindlimb agreement, rater I obtained a similar excellent degree of agreement to that for the forelimb, ranging from ICC 0.838 to 1 / p=0.0001. Whilst rater II achieved a lower agreement than rater I, the ICC was very good, ranging from 0.637 to 1, with only score 5 graded as satisfactory (ICC 0.637). Moreover, both raters obtained excellent intra-rater scores in the outcomes: combined total score, total crossing time, number of steps, total time stopped and total score for forelimb and hindlimb, ranging from ICC 0.806 to 0.993 for rater I and ICC 0.915 to 0.981 for rater II.

----- Table 4 here -----

Intra-rater reliability for mice

Overall, the intra-rater reliability for mice was excellent for both raters (Table 5). For rater I, in the forelimb foot placement agreement for all the 7 scores were excellent (ICC

0.939 to 1 / $p=0.0001$). For rater II, the agreement was also excellent, varying between ICC 0.778 and 0.968 for scores 0 to 5. However, score 6 was considered satisfactory (ICC 0.488 / $p=0.077$). Regarding the hindlimb placement, similar results were found, with the raters only differing in score 6 (rater II obtained a lower ICC: 0.749 / $p=0.002$) (Table 5).

----- Table 5 here -----

----- Figure 2 here -----

----- Figure 3 here -----

----- Figure 4 here -----

----- Figure 5 here -----

DISCUSSION

Studying walking adaptability in rodents is of importance to translational neuroscience, since the irregular distribution of the rungs in the walking path requires the animal's capacity to adjust its stride length, paw placement and control the center of mass. These adaptive motor control strategies are also found and widely studied in humans (Beauchet et al., 2008). Rodents and humans perform some similar movements to protect an injured limb and/or prevent falls (Jacobs, Kloefkorn & Allen, 2014). The ladder rung walking test fulfils the fundamental principles of walking adaptability such as pattern of rhythmic reciprocal limb movement; supporting body balance against gravity; and adapting locomotion in response to environmental challenges (Balasubramanian, Clark & Fox, 2014).

Metz and Whishaw created the ladder rung walking test in 2002 to assess forelimb and hindlimb stepping, placing, and coordination in models of cortical and subcortical injury. According to the authors, the test is a sensitive skilled task for assessing slight impairments of walking function and is useful when assessing functional recovery following brain or spinal cord injury and the effectiveness of rehabilitative therapies (Metz & Whishaw, 2002; Riek-Burchardt et al., 2004). Locomotion during the ladder rung walking test is known to depend on ascending and descending neural pathways, since accurately crossing the rungs requires finely adjusted motor control, balance, limb coordination and muscle control (Metz & Whishaw in 2002; Medeiros et al., 2018; Wearick-Silva et al., 2018).

However, to determine the psychometric properties of behavioral tests it is essential to obtain reliable, consistent and scientifically valid findings (Souza, Alexandre & Guirardello, 2017). Both, intra- and inter-rater agreement are important metrics to ensure reliability and reproducibility (Meseguer-Henarejos et al., 2018). Here, we sought to assess intra- and inter-rater agreement in the foot fault score of the ladder rung walking test using two strains of rodents – Wistar rats and C57BL/6 mice. Two independent researchers (with and without previous experience using the test's scoring system) analyzed the videos. Our findings suggest the foot fault score system of the ladder rung walking test is a useful, reliable and consistent tool for studying skilled walking performance in rodents. We also found excellent inter and intra-rater reliability for “total crossing time”, “number of stops” and “total time stopped”. The agreement measures provided by this study suggest data obtained by different research groups using the ladder rung walking test should be comparable (Hutchinson et al., 2017) and encourage the use of the test in further studies.

The ladder rung walking test is an interesting option for researchers investigating neural mechanisms involved in the ability to adapt walking (Metz, Schwab & Welzl, 2001; Metz, 2007; Medeiros et al., 2018; Wearick-Silva et al., 2018). Since the score reflects the animal's ability to adapt limb placement and position in a contextual environment (Metz & Whishaw, 2002; Jacobs; Kloefkorn & Allen, 2014), the foot fault score system is useful to study walking adaptability in rodents (Medeiros et al., 2018; Wearick-Silva et al., 2018). Whilst traditional biomechanical models of walking analysis require expensive devices, constant animal handling for placing reflective markers and development of signal-processing routines (Vrinten & Hamers, 2003; Berryman et al., 2009), the ladder rung walking test provides walking adaptability assessment using a fast, simple and inexpensive method.

Whereas we observed satisfactory to excellent intraclass correlation indexes in rating individual scores (0 to 6), caution is necessary when using the foot fault score system. Individual scores present subtle differences that may confuse untrained raters. For example, differentiating between scores 3 (replacement) and 4 (correction) requires attention to identify whether the rodent touched the rung before completing paw placement. Moreover, in some situations, the rodent supports a single paw simultaneously on two rungs that are placed too close each other. This may cause confusion in scoring 5 (partial placement) or 6 (correct placement). In addition, rodents sometimes place their paw on the acrylic wall to help walking forward, a behavior that is not considered in the foot fault score system. Furthermore, the subtle differences between score 1 (deep slip) and 2 (slight slip) may cause uncertainty for untrained raters. Finally, the speed of the video recording may also change the perception of

the raters during the gait cycle analysis (Spitz et al., 2017). Thus, the present results suggest experienced and inexperienced raters can get reliable results if appropriate training is provided. We highly recommend the careful study of the article and videos previously published by Metz and Whishaw (Metz & Whishaw, 2002; 2009) and supervised practice before using the foot fault scoring system.

Despite being originally designed for rats, the ladder rung walking test can be used in mice with some adjustments to the apparatus, namely a) the diameter of the rungs should be reduced to allow a proper grip and paw placement; and b) the minimal and maximal between-rung interval should be changed, as previously described (Farr et al., 2006; Wearick-Silva et al., 2018). Our findings show these adaptations are valid to obtain reliable results in C57BL/6 mice and may be valid for other mice strains.

This study has some limitations. First, we did not assess rodents with brain or spinal cord injuries, which may have limited movement variety in the test. Despite which, all individual scores (0 to 6) in the foot fault score were found the studied videos. Second, only two rodent strains were used in the study. Thus, further research assessing the foot fault score performance in a larger number of rodent strains may be useful to amplify its accuracy and reliability.

CONCLUSION

We conclude the foot fault score of the ladder rung walking test is a reliable and useful tool to study walking adaptability in rodents. Moreover, experienced and inexperienced raters can obtain reliable results if previous supervised training is provided. These findings are of importance for researchers working in the field of translational neuroscience and motor control and impact on the comparability of results obtained worldwide using the foot fault score in the ladder rung walking test.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Martins, L. A.; Schiavo, A.; Xavier, L. L. and Mestriner, R. G. contributed to the conception and design of the study. Martins, L. A. and Schiavo, A., organized the data and performed the statistical analysis. Martins, L. A.; Schiavo, A. and Mestriner, R.G. wrote the manuscript. All authors contributed to manuscript review, read and approved the submitted version.

FUNDING

This study was carried out with the support of the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001 and the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq).

CONFLICTS OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interests.

REFERENCES

- Altamentova, S., Rumajogee, P., Hong, J., Beldick, S. R., Park, S. J., Yee, A., & Fehlings, M. G. (2020). Methylprednisolone Reduces Persistent Post-ischemic Inflammation in a Rat Hypoxia-Ischemia Model of Perinatal Stroke. *Translational Stroke Research*, 1-20
- Antonow-Schlorke, I., Ehrhardt, J., & Knieling, M. (2013). Modification of the ladder rung walking task—new options for analysis of skilled movements. *Stroke research and treatment*, 2013. doi: 10.1155/2013/418627.
- Balasubramanian CK, Clark DJ, & Fox EJ. (2014). Walking adaptability after stroke and its assessment in clinical settings. *Stroke Res Treat*. doi:10.1155/2014/591013. doi: 10.1155/2014/591013.
- Bartko J. J. (1976). On various intraclass correlation reliability coefficients. *Psychological Bulletin*; 83(5):762–765. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.5.762>.
- Bauman, J. M., & Chang, Y. H. (2010). High-speed X-ray video demonstrates significant skin movement errors with standard optical kinematics during rat locomotion. *Journal of neuroscience methods*, 186(1), 18-24. doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.10.017.
- Berryman, E. R., Harris, R. L., Moalli, M., & Bagi, C. M. (2009). Digigait quantitation of gait dynamics in rat rheumatoid arthritis model. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 9(2), 89-98.
- Burchardt M. R, Noack P. H, Metz G. A, & Reymann K. G. (2004). Detection of chronic sensorimotor impairments in the ladder rung walking task in rats with endothelin-1-induced mild focal ischemia. *Journal of Neuroscience Methods*;137:227-233. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2004.02.012.
- Caetano, M. J. D., Lord, S. R., Brodie, M. A., Schoene, D., Pelicioni, P. H. S., Stumieks, D. L., & Menant, J. C. (2018). Executive functioning, concern about falling and quadriceps strength mediate the relationship between impaired gait adaptability and fall risk in older people. *Gait & Posture*, 59, 188–192. doi:10.1016/j.gaitpost.2017.10.017
- Ducharme, S. W., Liddy, J. J., Haddad, J. M., Busa, M. A., Claxton, L. J., & van Emmerik, R. E. (2018). Association between stride time fractality and gait adaptability during unperturbed and asymmetric walking. *Human movement science*, 58, 248-259. doi: 10.1016/j.humov.2018.02.011.

- Esteves, P. O., Oliveira, L. A. S., Nogueira-Campos, A. A., Saunier, G., Pozzo, T., Oliveira, J. M. & Vargas, C. D. (2016). Motor planning of goal-directed action is tuned by the emotional valence of the stimulus: a kinematic study. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep28780
- Faraji, J. & Metz, G. (2007). Sequential bilateral striatal lesions have additive effects on single skilled limb use in rats. *Behavioural Brain Research*, 177(2), 195–204. doi:10.1016/j.bbr.2006.11.034
- Farr, T. D., Liu, L., Colwell, K. L., Whishaw, I. Q., & Metz, G. A. (2006). Bilateral alteration in stepping pattern after unilateral motor cortex injury: a new test strategy for analysis of skilled limb movements in neurological mouse models. *Journal of neuroscience methods*, 153(1), 104-113.
- Filipe, V. M., Pereira, J. E., Costa, L. M., Maurício, A. C., Couto, P. A., Melo-Pinto, P., & Varejão, A. S. (2006). Effect of skin movement on the analysis of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats. *Journal of neuroscience methods*, 153(1), 55-61. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2005.10.006.
- Guo, Y., Hu, H., Wang, J., Zhang, M., & Chen, K. (2019). Walking Function After Cervical Contusion and Distraction Spinal Cord Injuries in Rats. *Journal of experimental neuroscience*, 13, 1179069519869615. doi: 10.1177/1179069519869615.
- Hawkins, K. A., Clark, D. J., Balasubramanian, C. K., & Fox, E. J. (2017). Walking on uneven terrain in healthy adults and the implications for people after stroke. *NeuroRehabilitation*, 41(4), 765-774. doi: 10.3233/NRE-172154.
- Houdijk, H., Van Ooijen, M. W., Kraal, J. J., Wiggerts, H. O., Polomski, W., Janssen, T. W. J., & Roerdink, M. (2012). Assessing Gait Adaptability in People With a Unilateral Amputation on an Instrumented Treadmill With a Projected Visual Context. *Physical Therapy*, 92(11), 1452–1460. doi:10.2522/ptj.20110362
- Hutchinson D, Hines S, Vijayaraghavan N, Sammond A, Wilson KM, & Kuchera ML (2017). Interexaminer reliability study of a standardized myofascial diagnostic technique of the superior thoracic inlet. *Journal of Bodywork and Movement Therapies*;21(3):658-663. doi: 10.1016/j.jbmt.2017.05.004.
- Jacobs, B. Y., Kloefkorn, H. E., & Allen, K. D. (2014). Gait Analysis Methods for Rodent Models of Osteoarthritis. *Current Pain and Headache Reports*, 18(10). doi:10.1007/s11916-014-0456-x.
- Lanini, J., Duburcq, A., Razavi, H., Le Goff, C. G., & Ijspeert, A. J. (2017). Interactive locomotion: Investigation and modeling of physically-paired humans while walking. *PLoS one*, 12(9), e0179989. doi: 10.1371/journal.pone.0179989.
- Medeiros, F. M., de Carvalho Myskiw, J., Baptista, P. P. A., Neves, L. T., Martins, L. A., Furini, C. R. G., Izquierdo, I., Xavier, L. L., Hollands, K., & Mestriner, R. G. (2018). Can an aversive, extinction-resistant memory trigger impairments in walking adaptability? An

experimental study using adult rats. *Neuroscience letters*, 665, 224-228. doi: 10.1016/j.neulet.2017.12.017.

Meseguer-Henarejos, A. B., Sanchez-Meca, J., Lopez-Pina, J. A., & Carles-Hernandez, R. (2018). Inter-and intra-rater reliability of the Modified Ashworth Scale: a systematic review and meta-analysis. *European journal of physical and rehabilitation medicine*, 54(4), 576-590. doi: 10.23736/S1973-9087.17.04796-7.

Mestriner, R. G., Miguel, P. M., Bagatini, P. B., Saur, L., Boisserand, L. S. B., Baptista, P. P. A., Xavier, L. L. & Netto, C. A. (2013). Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. *Behavioural brain research*, 244, 82-89. doi: 10.1016/j.bbr.2013.02.001.

Metz, G. A., & Whishaw, I. Q. (2009). The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. *Journal of Visualized Experiments*, (28). doi:10.3791/1204. doi: 10.3791/1204.

Metz, G. A., & Whishaw, I. Q. (2002). Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *Journal of Neuroscience Methods*, 115(2), 169–179. doi:10.1016/s0165-0270(02)00012-2

Metz, G. A., Ng, J. W., Kovalchuk, I., & Olson, D. M. (2015). Ancestral experience as a game changer in stress vulnerability and disease outcomes. *Bioessays*, 37(6), 602-611. doi: 10.1002/bies.201400217.

Riek-Burchardt, M., Henrich-Noack, P., Metz, G. A., & Reymann, K. G. (2004). Detection of chronic sensorimotor impairments in the ladder rung walking task in rats with endothelin-1-induced mild focal ischemia. *Journal of neuroscience methods*, 137(2), 227-233. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2004.02.012.

Sandner, B., Puttagunta, R., Motsch, M., Bradke, F., Ruschel, J., Blesch, A., & Weidner, N. (2018). Systemic epothilone D improves hindlimb function after spinal cord contusion injury in rats. *Experimental neurology*, 306, 250-259. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.01.018

Soleman, S., Yip, P., Leasure, J. L., & Moon, L. (2010). Sustained sensorimotor impairments after endothelin-1 induced focal cerebral ischemia (stroke) in aged rats. *Experimental neurology*, 222(1), 13-24. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.11.007.

Souza, A. C., Alexandre, N. M. C. & Guirardello, E. B. (2017). Psychometric properties in instruments evaluation of reliability and validity. *Epidemiol. Serv. Saúde* [online]., vol.26, n.3, pp.649-659. ISSN 1679-4974. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742017000300022>. doi: 10.5123/S1679-49742017000300022.

Shimada H., Ishii K., Ishiwata K., Oda K., Sukukawa M., Makizako H., Doi T., & Suzuki T.(2013). Gait adaptability and brain activity during unaccustomed treadmill walking in healthy elderly females. *Gait & Posture*;38:203-208. doi: 10.1016/j.gaitpost.2012.11.008.

Shrout, P. E., & Fleiss, J. L. (1979). Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychological bulletin*, 86(2), 420. doi: 10.1037//0033-2909.86.2.420.

Spitz, J., Put, K., Wagemans, J., Williams, A. M., & Helsen, W. F. (2017). Does slow motion impact on the perception of foul play in football?. *European journal of sport science*, 17(6), 748-756. doi: 10.1080/17461391.2017.1304580

Ueda, Y., Misumi, S., Suzuki, M., Ogawa, S., Nishigaki, R., Ishida, A., Jung, C. & Hida, H. (2018). Disorganization of oligodendrocyte development in the layer II/III of the sensorimotor cortex causes motor coordination dysfunction in a model of white matter injury in neonatal rats. *Neurochemical research*, 43(1), 136-146. doi: 10.1007/s11064-017-2352-3.

Van Ooijen M. W., Heeren A., Smulders K., Geurts A. C. H., Janssen T. W. J., Beek P. J., Weerdesteyn V., Roerdink M. (2015). Improved gait adjustments after gait adaptability training are associated with reduced attentional demands in persons with stroke. *Experimental Brain Research*;233:1007-1018. doi: 10.1007/s00221-014-4175-7.

Vrinten, D. H., & Hamers, F. F. (2003). "CatWalk" automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. *Pain*, 102(1), 203–209. doi:10.1016/s0304-3959(02)00382-2.

Wearick-Silva, L. E., Orso, R., Martins, L. A., Creutzberg, K. C., Centeno-Silva, A., Xavier, L. L., Grassi-Oliveira, R., Mestriner, R. G. (2018). Dual influences of early life stress induced by limited bedding on walking adaptability and Bdnf/TrkB and Drd1/Drd2 gene expression in different mouse brain regions. *Behavioural Brain Research*. doi:10.1016/j.bbr.2018.10.025.

Figure Legend

Figure 1. Schematic illustration of the ladder rung walking test apparatus.

Figure 2. SWPS obtained by Rater I and Rater II.

Figure 3. SWPS obtained at first (a) and second assessment (b) by Rater I and Rater II.

Figure 4. Frequency of scores in the foot fault score (%).

Figure 5. Frequency of scores in the foot fault score (%) in the first (a) and second assessment (b) by Rater I and Rater II.

Figure 1

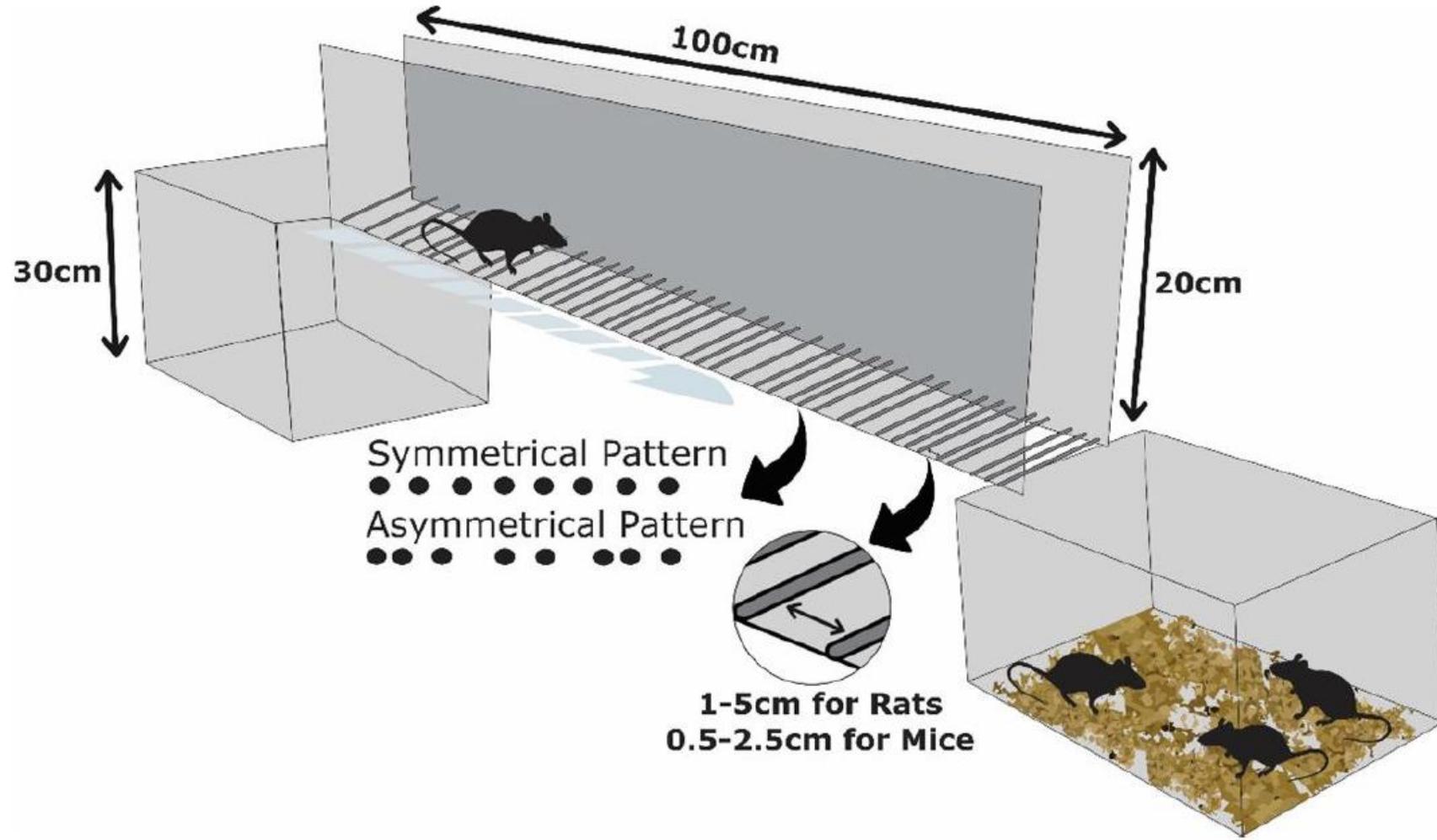


Figure 2

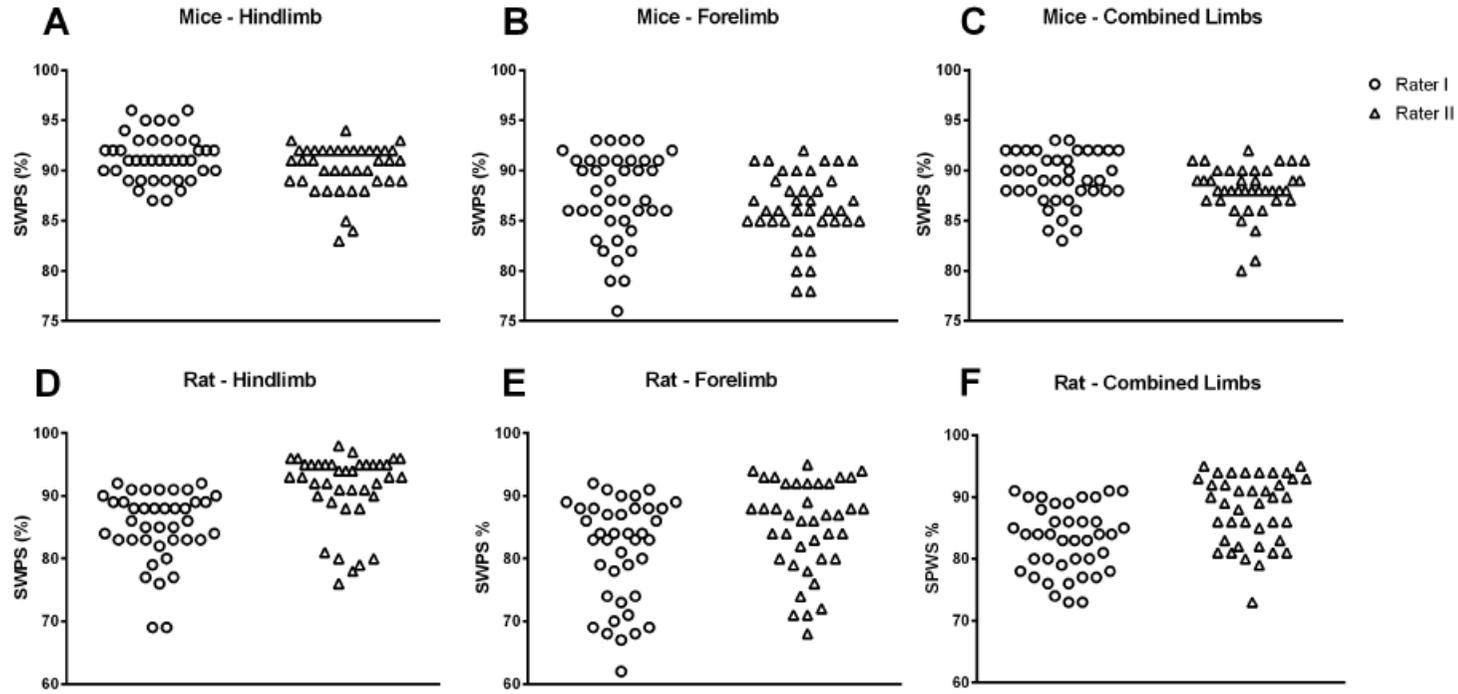


Figure 3

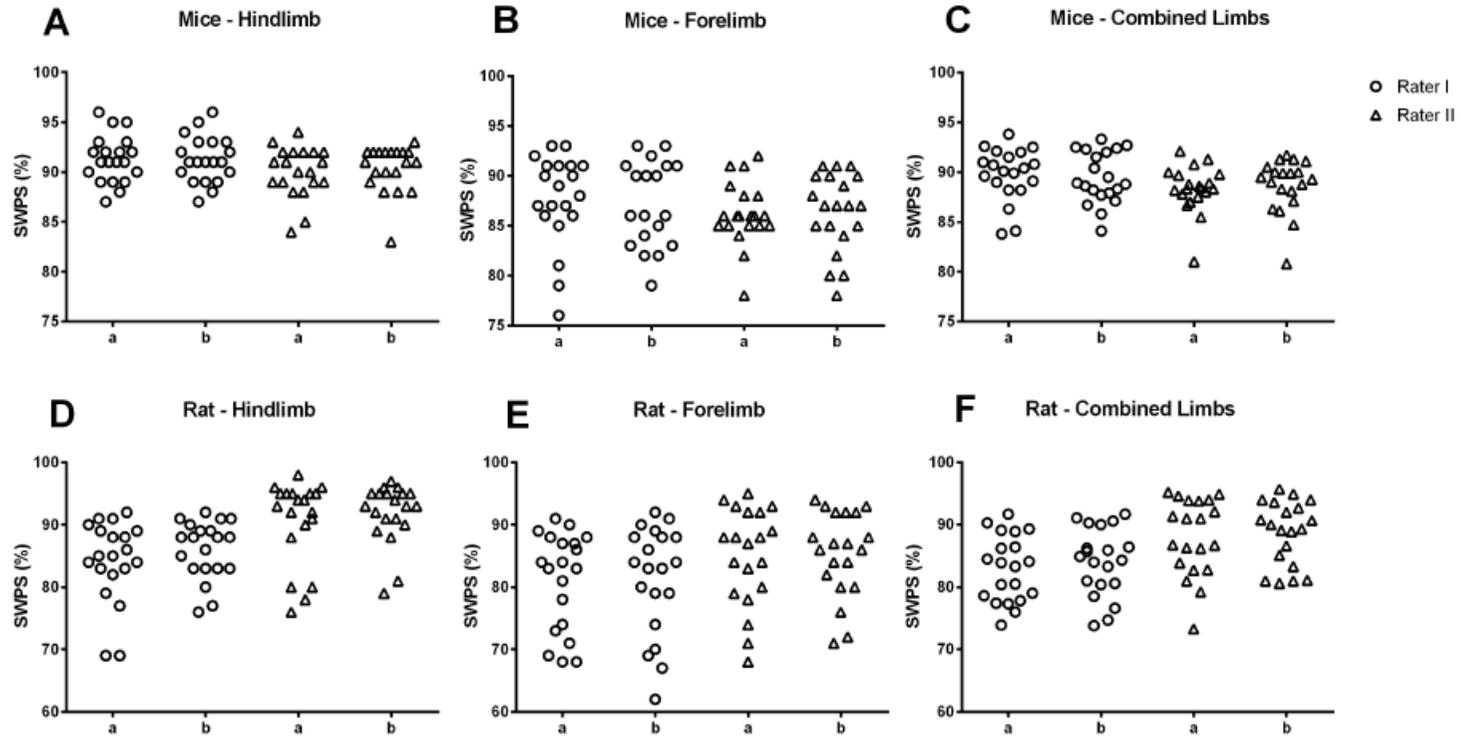


Figure 4

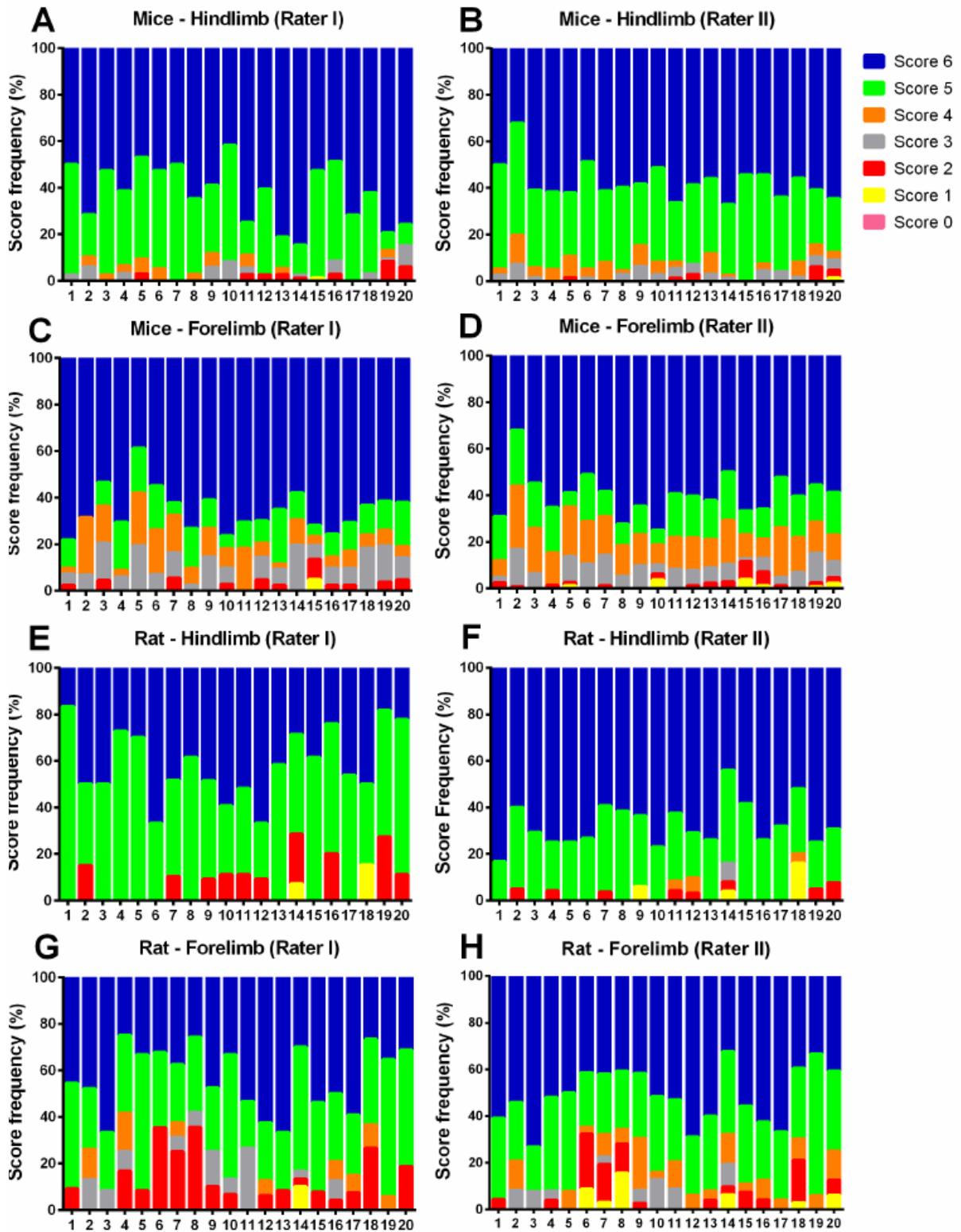


Table 1

Table 1. Rating scale for foot placement in the LRWT.

| Category | Type of foot misplacement |
|----------|---------------------------|
| 0 | Total miss |
| 1 | Deep Slip |
| 2 | Slight Slip |
| 3 | Replacement |
| 4 | Correction |
| 5 | Partial Placement |
| 6 | Correct Placement |

Table 2

Table 2. Agreement between raters I and II regarding the outcomes obtained in the LRWT in rat.

| Foot fault scoring in rat | | | |
|----------------------------------|--------------------|-------------------------|----------------|
| Outcome | ICC (IC95%) | Cronbach's Alpha | p Value |
| Combined Total Score | 0.938(0.844-0.976) | 0.938 | 0.0001* |
| Total Crossing Time | 0.994(0.985-0.998) | 0.994 | 0.0001* |
| Number of Stops | 0.957(0.892-0.983) | 0.957 | 0.0001* |
| Total Time Stopped | 0.992(0.980-0.997) | 0.992 | 0.0001* |
| Forelimb Placement | | | |
| Outcome | | | |
| Score 0 | 1(1-1) | 1 | 0.0001* |
| Score 1 | 0.839(0.594-0.936) | 0.839 | 0.0001* |
| Score 2 | 0.903(0.754-0.961) | 0.903 | 0.0001* |
| Score 3 | 0.721(0.295-0.889) | 0.721 | 0.004* |
| Score 4 | 0.551(0.000-0.822) | 0.551 | 0.045* |
| Score 5 | 0.854(0.631-0.942) | 0.854 | 0.0001* |
| Score 6 | 0.813(0.528-0.926) | 0.813 | 0.0001* |
| Total Score | 0.879(0.695-0.952) | 0.879 | 0.0001* |
| Hindlimb Placement | | | |
| Outcome | | | |
| Score 0 | 0.889(0.719-0.956) | 0.889 | 0.0001* |
| Score 1 | 0.931(0.826-0.973) | 0.931 | 0.0001* |
| Score 2 | 0.593(0.000-0.839) | 0.593 | 0.028* |
| Score 3 | 0.889(0.719-0.956) | 0.889 | 0.0001* |
| Score 4 | 0.889(0.719-0.956) | 0.889 | 0.0001* |
| Score 5 | 0.41(0.000-0.620) | 0.41 | 0.456 |
| Score 6 | 0.592(0.000-0.839) | 0.592 | 0.029* |
| Total Score | 0.931(0.826-0.973) | 0.931 | 0.0001* |

* Statistically significant difference.

Table 3

Table 3. Agreement between raters I and II regarding the outcomes (scores) recorded in the LRWT in mice.

| Foot fault scoring in mice | | | |
|-----------------------------------|--------------------|-------------------------|----------------|
| Outcome | ICC (IC95%) | Cronbach's Alpha | P Value |
| Combined Total Score | 0.954(0.883-0.982) | 0.954 | 0.0001* |
| Total Crossing Time | 1(0.999-1) | 1 | 0.0001* |
| Number of Stops | 0.922(0.802-0.969) | 0.922 | 0.0001* |
| Total Time Stopped | 0.998(0.995-0.999) | 0.998 | 0.0001* |
| Forelimb Placement | | | |
| Outcome | | | |
| Score 0 | 0.889(0.719-0.956) | 0.889 | 0.0001* |
| Score 1 | 0.755(0.381-0.903) | 0.755 | 0.002* |
| Score 2 | 0.699(0.239-0.881) | 0.699 | 0.006* |
| Score 3 | 0.466(0.000-0.789) | 0.466 | 0.090 |
| Score 4 | 0.904(0.757-0.962) | 0.904 | 0.0001* |
| Score 5 | 0.830(0.571-0.933) | 0.830 | 0.0001* |
| Score 6 | 0.712(0.271-0.886) | 0.721 | 0.005* |
| Total Score | 0.925(0.812-0.970) | 0.925 | 0.0001* |
| Hindlimb Placement | | | |
| Outcome | | | |
| Score 0 | 0.822(0.550-0.929) | 0.822 | 0.0001* |
| Score 1 | 0.889(0.719-0.956) | 0.889 | 0.0001* |
| Score 2 | 0.938(0.844-0.976) | 0.938 | 0.0001* |
| Score 3 | 0.751(0.371-0.901) | 0.751 | 0.002* |
| Score 4 | 0.484(0.000-0.796) | 0.484 | 0.079 |
| Score 5 | 0.622(0.046-0.850) | 0.622 | 0.0001* |
| Score 6 | 0.764(0.405-0.907) | 0.764 | 0.001* |
| Total Score | 0.919(0.795-0.968) | 0.919 | 0.0001* |

* Statistically significant difference.

Table 4

Table 4. Intra-rater agreement on outcomes in the analyses of the LRWT in rat.

| Outcome | Rater I | | | Rater II | | |
|---------------------------|--------------------|------------------|---------|--------------------|------------------|---------|
| | ICC (IC95%) | Cronbach's Alpha | P Value | ICC (IC95%) | Cronbach's Alpha | P Value |
| Combined Total Score | 0.969(0.922-0.988) | 0.969 | 0.0001* | 0.950(0.875-0.980) | 0.950 | 0.0001* |
| Total Crossing Time | 0.993(0.982-0.997) | 0.993 | 0.0001* | 0.981(0.953-0.993) | 0.981 | 0.0001* |
| Number of Stops | 0.950(0.873-0.980) | 0.950 | 0.0001* | 0.915(0.786-0.966) | 0.915 | 0.0001* |
| Total Time Stopped | 0.806(0.509-0.923) | 0.806 | 0.0001* | 0.939(0.847-0.976) | 0.939 | 0.0001* |
| Forelimb Placement | | | | | | |
| Score 0 | 0.899(0.719-0.956) | 0.899 | 0.0001* | 0.919(0.796-0.968) | 0.919 | 0.0001* |
| Score 1 | 0.889(0.719-0.956) | 0.889 | 0.0001* | 0.842(0.600-0.937) | 0.842 | 0.0001* |
| Score 2 | 0.989(0.973-0.996) | 0.989 | 0.0001* | 0.877(0.688-0.951) | 0.877 | 0.0001* |
| Score 3 | 0.978(0.944-0.991) | 0.978 | 0.0001* | 0.920(0.797-0.968) | 0.920 | 0.0001* |
| Score 4 | 0.941(0.851-0.977) | 0.941 | 0.0001* | 0.849(0.618-0.940) | 0.849 | 0.0001* |
| Score 5 | 0.948(0.869-0.979) | 0.948 | 0.0001* | 0.787(0.462-0.916) | 0.787 | 0.001* |
| Score 6 | 0.905(0.761-0.963) | 0.905 | 0.0001* | 0.652(0.121-0.862) | 0.652 | 0.13 |
| Total Score | 0.916(0.787-0.967) | 0.916 | 0.0001* | 0.875(0.685-0.951) | 0.875 | 0.0001* |
| Hindlimb Placement | | | | | | |
| Score 0 | 1(1-1) | 1 | 0.0001* | 1(1-1) | 1 | 0.0001* |
| Score 1 | 1(1-1) | 1 | 0.0001* | 0.962(0.904-0.985) | 0.962 | 0.0001* |
| Score 2 | 0.838(0.591-0.936) | 0.838 | 0.0001* | 0.829(0.567-0.932) | 0.829 | 0.0001* |
| Score 3 | 1(1-1) | 1 | 0.0001* | 1(1-1) | 1 | 0.0001* |
| Score 4 | 1(1-1) | 1 | 0.0001* | 0.904(0.758-0.962) | 0.904 | 0.0001* |
| Score 5 | 0.992(0.980-0.997) | 0.992 | 0.0001* | 0.637(0.83-0.856) | 0.637 | 0.16 |
| Score 6 | 0.982(0.954-0.993) | 0.982 | 0.0001* | 0.810(0.519-0.925) | 0.810 | 0.0001* |
| Total Score | 0.988(0.970-0.995) | 0.988 | 0.0001* | 0.970(0.924-0.988) | 0.970 | 0.0001* |

* Statistically significant difference.

Table 5

Table 5. Intra-rater agreement on outcomes in the analyses of the LRWT in mice.

| Outcome | Rater I | | | Rater II | | |
|---------------------------|--------------------|------------------|---------|--------------------|------------------|---------|
| | ICC (IC95%) | Cronbach's Alpha | P Value | ICC (IC95%) | Cronbach's Alpha | P Value |
| Combined Total Score | 0.971(0.926-0.988) | 0.971 | 0.0001* | 0.963(0.906-0.985) | 0.963 | 0.0001* |
| Total Crossing Time | 1(1-1) | 1 | 0.0001* | 0.999(0.998-1) | 0.999 | 0.0001* |
| Number of Stops | 0.948(0.868-0.979) | 0.948 | 0.0001* | 0.774(0.429-0.911) | 0.774 | 0.001* |
| Total Time Stopped | 0.988(0.969-0.995) | 0.988 | 0.0001* | 0.985(0.963-0.994) | 0.985 | 0.0001* |
| Forelimb Placement | | | | | | |
| Score 0 | 1(1-1) | 1 | 0.0001* | 0.919(0.796-0.968) | 0.919 | 0.0001* |
| Score 1 | 1(1-1) | 1 | 0.0001* | 0.778(0.440-0.912) | 0.778 | 0.001* |
| Score 2 | 0.979(0.947-0.992) | 0.979 | 0.0001* | 0.829(0.568-0.932) | 0.829 | 0.0001* |
| Score 3 | 0.979(0.948-0.992) | 0.979 | 0.0001* | 0.899(0.746-0.960) | 0.899 | 0.0001* |
| Score 4 | 0.939(0.846-0.976) | 0.939 | 0.0001* | 0.956(0.888-0.982) | 0.956 | 0.0001* |
| Score 5 | 0.982(0.965-0.995) | 0.982 | 0.0001* | 0.928(0.817-0.971) | 0.928 | 0.0001* |
| Score 6 | 0.950(0.873-0.980) | 0.950 | 0.0001* | 0.488(0.000-0.797) | 0.488 | 0.077 |
| Total Score | 0.978(0.944-0.991) | 0.978 | 0.0001* | 0.934(0.833-0.974) | 0.934 | 0.0001* |
| Hindlimb Placement | | | | | | |
| Score 0 | 0.919(0.796-0.968) | 0.919 | 0.0001* | 1(1-1) | 1 | 0.0001* |
| Score 1 | 0.889(0.719-0.956) | 0.889 | 0.0001* | 0.889(0.719-0.956) | 0.889 | 0.0001* |
| Score 2 | 0.978(0.945-0.991) | 0.978 | 0.0001* | 0.963(0.908-0.986) | 0.936 | 0.0001* |
| Score 3 | 0.936(0.839-0.975) | 0.936 | 0.0001* | 0.821(0.548-0.929) | 0.821 | 0.0001* |
| Score 4 | 1(1-1) | 1 | 0.0001* | 0.886(0.713-0.955) | 0.886 | 0.0001* |
| Score 5 | 0.982(0.953-0.993) | 0.982 | 0.0001* | 0.861(0.649-0.945) | 0.861 | 0.0001* |
| Score 6 | 0.958(0.895-0.983) | 0.958 | 0.0001* | 0.749(0.367-0.901) | 0.749 | 0.002* |
| Total Score | 0.950(0.873-0.980) | 0.950 | 0.0001* | 0.951(0.876-0.981) | 0.951 | 0.0001* |

* Statistically significant difference.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da marcha em modelos murinos é útil para entender mudanças comportamentais, bem como compreender os diferentes aspectos da neurobiologia da caminhada normal e patológica em níveis celular e molecular (JACOBS; KLOEFKORN; ALLEN, 2014; LAKES; ALLEN, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2018; WEARICK-SILVA *et al.*, 2018). Atualmente, a capacidade de adaptação da caminhada/locomoção pode ser mensurada de diferentes formas, existindo diversos recursos tecnológicos para tal, tais como sistemas de câmeras optoeletrônicas, plataformas de força, sensores inerciais e filmadoras, sendo possível realizar uma análise dos parâmetros espaço-temporais por meio de diferentes técnicas - desde uma pontuação observacional até um sistema mais complexo e personalizado (LAKES; ALLEN, 2016).

Contudo, em roedores, muitas destas tecnologias ainda não são facilmente aplicáveis ou acessíveis. Deste modo, o TEH é uma excelente ferramenta para inferir sobre a adaptabilidade da marcha em murinos, com pouca necessidade de manuseio dos animais e interferência do pesquisador em comparação com os métodos biomecânicos tradicionais. Assim, a análise cinemática qualitativa ainda é largamente empregada na maioria dos estudos com modelos murinos. Entretanto, a sistematização deste processo observacional é necessária, com a conversão das observações qualitativas em dados quantitativos. Assim, sem este recurso metodológico, provavelmente seríamos incapazes de detectar compensações ou adaptações sutis durante a locomoção (METZ; WISHAW 2002; METZ; WISHAW, 2009; FERLAND *et al.*, 2011; JACOBS; KLOEFKORN; ALLEN, 2014; LAKES; ALLEN, 2016).

Em 2002 os pesquisadores canadenses Gerlinde Metz e Ian Wishaw desenvolveram o TEH como uma alternativa para quantificar a habilidade da marcha de roedores. Nesta publicação, os autores descrevem o teste e demonstram que ele é capaz de identificar diferenças nos escores obtidos por animais lesados e controles. Ainda, os mesmos autores demonstraram que o teste detecta diferenças entre animais adultos e idosos (MERRETT; KIRKLAND; METZ, 2010), bem como é capaz de diferenciar animais estressados de controles (METZ; JADAVJI; SMITH, 2005), o que foi corroborado em estudos prévios (MEDEIROS *et al.*, 2018; WEARICK- SILVA *et al.*,

2018). Atualmente, o teste permanece relevante para o estudo da habilidade/capacidade de adaptação da marcha de roedores.

Embora o TEH permita que os pesquisadores verifiquem a colocação das patas e o posicionamento dos dígitos nas barras durante a locomoção (METZ; WISHAW, 2002, MESTRINER *et al.*, 2015), bem como observar e quantificar a tomada de decisão e correção de movimentos do animal durante a caminhada - características estas que são importantes para investigar sobre a neurobiologia da adaptabilidade da marcha (MEDEIROS *et al.*, 2018; WEARICK-SILVA, *et al.*, 2018), o escore de desempenho do teste ainda não tinha sido avaliado quanto à sua reprodutibilidade e consistência, por diferentes avaliadores. Desta maneira, o resultado deste estudo demonstrou que o TEH é consistente para análises feitas por avaliadores com ou sem experiência prévia com o teste, desde que sejam devidamente treinados.

Ante ao exposto nesta dissertação, acreditamos que o trabalho realizado possa contribuir sobremaneira para a área da neurociência do controle cognitivo-motor (mais conhecida como controle motor), confirmando a utilidade científica do TEH. A partir da utilização do teste, poder-se-á seguir na busca das relações entre a adaptabilidade da marcha em roedores e seus construtos neurobiológicos subjacentes.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que o escore de pontos do TEH é uma ferramenta útil, consistente e reprodutível para estudar a adaptabilidade da marcha em roedores. Além disso, avaliadores experientes e inexperientes podem obter resultados confiáveis, desde que treinados previamente sob supervisão. Essas descobertas são importantes para pesquisadores que trabalham no campo da neurociência e do controle motor, com impacto na comparabilidade dos resultados com o TEH obtidos em todo o mundo.

REFERÊNCIAS

- ALLALI, G., VAN DER MEULEN, M., BEAUCHET, O., RIEGER, S. W., VUILLEUMIER, P... ASSAL, F. The neural basis of age-related changes in motor imagery of gait: an fMRI study. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 69(11), 1389-1398, 2013.
- ANTONOW-SCHLORKE, I., EHRHARDT, J.; KNIELING, M. Modification of the ladder rung walking task—new options for analysis of skilled movements. *Stroke research and treatment*, 2013.
- ANNWEILER, C., BEAUCHET, O., BARTHA, R., WELLS, J. L., BORRIE, M. J., HACHINSKI, V... MONTERO-ODASSO, M. Motor cortex and gait in mild cognitive impairment: a magnetic resonance spectroscopy and volumetric imaging study. *Brain*, v. 136, n. 3, p. 859-871, 2013.
- BALASUBRAMANIAN CK, CLARK DJ, FOX EJ. Walking adaptability after stroke and its assessment in clinical settings. *Stroke Res Treat*, 2014.
- BAUMAN, J. M., CHANG, Y. H. High-speed X-ray video demonstrates significant skin movement errors with standard optical kinematics during rat locomotion. *Journal of neuroscience methods*, 186(1), 18-24, 2010.
- BEAUCHET, O., ALLALI, G., BERRUT, G., HOMMET, C., DUBOST, V., ASSAL, F. Gait analysis in demented subjects: Interests and perspectives. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 4(1), 155. 2008.
- BUITRAGO, M. M., SCHULZ, J. B., DICHGANS, J., LUFT, A. R. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiology of learning and memory*, 81(3), 211-216. 2004.
- BUIJN, S. M., VAN IMPE, A., DUYSSENS, J., SWINNEN, S. P. Split-belt walking: adaptation differences between young and older adults. *Journal of neurophysiology*, 108(4), 1149-1157, 2012.
- CAETANO MJD, LORD SR, BRODIE MA, SCHOENE D, PELICIONI PHS, STURNIEK S DL, MENANTJC. Executive functioning, concern about falling and quadriceps strength mediate the relationship between impaired gait adaptability and fall risk in older people. *Gait & Posture* 59:188-192.6, 2018
- CARTER RJ, LIONE LA, HUMBY T, MANGIARINI L, MAHAL A, BATES GP, et al. Characterization of progressive motor deficits in mice transgenic for the human Huntington's disease mutation. *J Neurosci.*; 19:3248–57, 1999
- CHOI, J. T., BASTIAN, A. J. Adaptation reveals independent control networks for human walking. *Nature neuroscience*, 10(8), 1055, 2007.
- CROMWELL, R. L., PIDCOE, P. E., GRIFFIN, L. A., SOTILLO, T., GANNINGER, D., FEAGIN, M. Adaptations in horizontal head stabilization in response to altered vision and gaze during natural walking. *Journal of Vestibular Research*, 14(5), 367-373, 2004.
- CUMMINGS, B. J., ENGESESSER-CESAR, C., CADENA, G., & ANDERSON, A. J. Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behavioural brain research*, 177(2), 232-241, 2007.
- DUCHARME, S. W., LIDDY, J. J., HADDAD, J. M., BUSA, M. A., CLAXTON, L. J., VAN EMMERIK, R. E. Association between stride time fractality and gait adaptability during unperturbed and asymmetric walking. *Human movement science*, 58, 248-259, 2018.

- ELLENBROEK, B., YOUN, J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race. *Disease models & mechanisms*, 9(10), 1079-1087, 2016.
- ESTEVEZ, P. O., OLIVEIRA, L. A. S., NOGUEIRA-CAMPOS, A. A., SAUNIER, G., POZZO, T., OLIVEIRA, J. M., VARGAS, C. D. Motor planning of goal-directed action is tuned by the emotional valence of the stimulus: a kinematic study. *Scientific reports*, 6, 28780, 2016.
- FARAJI J, METZ GA. Sequential bilateral striatal lesions have additive effects on single skilled limb use in rats. *Behavioural Brain Research*; 177:195-204, 2007
- FILIPE, V. M., PEREIRA, J. E., COSTA, L. M., MAURÍCIO, A. C., COUTO, P. A., MELO-PINTO, P., VAREJÃO, A. S. Effect of skin movement on the analysis of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats. *Journal of neuroscience methods*, 153(1), 55-61, 2006.
- GALLIVAN, J. P., CHAPMAN, C. S., WOLPERT, D. M., & FLANAGAN, J. R. Decision-making in sensorimotor control. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(9), 519-534, 2018.
- GUO, Y., HU, H., WANG, J., ZHANG, M., & CHEN, K. Walking Function After Cervical Contusion and Distraction Spinal Cord Injuries in Rats. *Journal of experimental neuroscience*, 13, 1179069519869615, 2019.
- HAUSDORFF, J. M., SCHWEIGER, A., HERMAN, T., YOGEV-SELIGMANN, G., & GILADI, N. Dual-task decrements in gait: contributing factors among healthy older adults. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(12), 1335-1343, 2008.
- HAWKINS, K. A., CLARK, D. J., BALASUBRAMANIAN, C. K., FOX, E. J. Walking on uneven terrain in healthy adults and the implications for people after stroke. *NeuroRehabilitation*, 41(4), 765-774, 2017.
- HICKEY, M. A., KOSMALSKA, A., ENAYATI, J., COHEN, R., ZEITLIN, S., LEVINE, M. S., & CHESSELET, M. F. Extensive early motor and non-motor behavioral deficits are followed by striatal neuronal loss in knock-in Huntington's disease mice. *Neuroscience*, 157(1), 280-295, 2008.
- HOUDIJK H, VAN OOIJEN MW, KRAAL JJ, WIGGERTS HO, POLOMSKI W, JANSSEN TWJ, ROERDINK M. Assessing gait adaptability in people with a unilateral amputation on an instrumented treadmill with a projected visual context. *Phys Ther*. 92:1452–60, 2012
- HOFFLAND, B. S., VEUGEN, L. C., JANSSEN, M. M. H. P., PASMEN, J. W., WEERDESTEYN, V., VAN DE WARRENBURG, B. P. A gait paradigm reveals different patterns of abnormal cerebellar motor learning in primary focal dystonias. *The Cerebellum*, 13(6), 760-766, 2014.
- INGRAM, J. N., WOLPERT, D. M. Naturalistic approaches to sensorimotor control. *In Progress in Brain Research* 191, 3-29, 2011.
- KAASINEN, V., RINNE, J. O. Functional imaging studies of dopamine system and cognition in normal aging and Parkinson's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 26(7), 785-793, 2002.
- KENNEDY, K. M., RAZ, N. Age, sex and regional brain volumes predict perceptual-motor skill acquisition. *Cortex*, 41(4), 560-569, 2005.
- LANINI, J., DUBURCQ, A., RAZAVI, H., LE GOFF, C. G., IJSPEERT, A. J. Interactive locomotion: Investigation and modeling of physically-paired humans while walking. *PLoS one*, 12(9), e0179989, 2017.
- LEBLOND, H., L'ESPÉRANCE, M., ORSAL, D., ROSSIGNOL, S. Treadmill locomotion in the intact and spinal mouse. *Journal of Neuroscience*, 23(36), 11411-11419, 2003.

MEDEIROS, F. M., DE CARVALHO MYSKIW, J., BAPTISTA, P. P. A., NEVES, L. T., MARTINS, L. A., FURINI, C. R. G., MESTRINER, R. G. Can an aversive, extinction-resistant memory trigger impairments in walking adaptability? An experimental study using adult rats. *Neuroscience letters*, 665, 224-228, 2018.

MENDES, C. S., BARTOS, I., MÁRKA, Z., AKAY, T., MÁRKA, S., MANN, R. S. Quantification of gait parameters in freely walking rodents. *BMC biology*, 13(1), 50, 2015.

MENZ, H. B., LORD, S. R., FITZPATRICK, R. C. Acceleration patterns of the head and pelvis when walking are associated with risk of falling in community-dwelling older people. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 58(5), M446-M452, 2003.

MERRETT, D. L., KIRKLAND, S. W., METZ, G. A. Synergistic effects of age and stress in a rodent model of stroke. *Behavioural brain research*, 214(1), 55-59, 2010.

MESTRINER, R. G., MIGUEL, P. M., BAGATINI, P. B., SAUR, L., BOISSERAND, L. S. B., BAPTISTA, P. P. A., NETTO, C. A. Behavior outcome after ischemic and hemorrhagic stroke, with similar brain damage, in rats. *Behavioural brain research*, 244, 82-89, 2013.

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

METZ, G. A., JADAVJI, N. M., SMITH, L. K. Modulation of motor function by stress: a novel concept of the effects of stress and corticosterone on behavior. *European Journal of Neuroscience*, 22(5), 1190-1200, 2005.

METZ GA, WHISHAW IQ. The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. *Journal of Visualized Experiments* 28:1204, 2009.

METZ, G. A., NG, J. W., KOVALCHUK, I., OLSON, D. M. Ancestral experience as a game changer in stress vulnerability and disease outcomes. *Bioessays*, 37(6), 602-611, 2015.

PARKER, C. C., CHEN, H., FLAGEL, S. B., GEURTS, A. M., RICHARDS, J. B., ROBINSON, T. E., PALMER, A. A. Rats are the smart choice: rationale for a renewed focus on rats in behavioral genetics. *Neuropharmacology*, 76, 250-258, 2014.

RASMUSSEN, L. J. H., CASPI, A., AMBLER, A., BROADBENT, J. M., COHEN, H. J., D'ARBELOFF, T HOUTS, R. Association of Neurocognitive and Physical Function With Gait Speed in Midlife. *JAMA Network Open*, 2(10), e1913123-e1913123, 2019.

ROGERS, H. L., CROMWELL, R. L., GRADY, J. L. Adaptive changes in gait of older and younger adults as responses to challenges to dynamic balance. *Journal of aging and physical activity*, 16(1), 85-96, 2008.

SANDNER, B., PUTTAGUNTA, R., MOTSCH, M., BRADKE, F., RUSCHEL, J., BLESCH, A., WEIDNER, N. Systemic epothilone D improves hindlimb function after spinal cord contusion injury in rats. *Experimental neurology*, 306, 250-259, 2018.

SHIMADAH, ISHII K, ISHIWATA K, ODA K, SUKUKAWA M, MAKIZAKO H, DOI T, SUZUKIT. Gait adaptability and brain activity during unaccustomed treadmill walking in healthy elderly females. *Gait & Posture* 38:203-208, 2013.

SOLEMAN, S., YIP, P., LEASURE, J. L., MOON, L. Sustained sensorimotor impairments after endothelin-1 induced focal cerebral ischemia (stroke) in aged rats. *Experimental neurology*, 222(1), 13-24, 2010.

- SANTOS, TIAGO BORTOLETTO LINO. Tamanho de amostra para o teste-reteste na determinação do coeficiente de correlação intraclasse. 2018. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Estatística) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/22300> acesso: 20 de Março de 2019.
- TEICHER, M. H., ANDERSEN, S. L., POLCARI, A., ANDERSON, C. M., NAVALTA, C. P., KIM, D. M. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neuroscience & biobehavioral reviews*, 27(1-2), 33-44, 2003.
- THIES, S. B.; RICHARDSON, J. K.; ASHTON-MILLER, J. A. Effects of surface irregularity and lighting on step variability during gait: a study in healthy young and older women. *Gait Posture*, v. 22, n. 1, p. 26-31, 2005.
- UEDA, Y., MISUMI, S., SUZUKI, M., OGAWA, S., NISHIGAKI, R., ISHIDA, A., HIDA, H. Disorganization of oligodendrocyte development in the layer II/III of the sensorimotor cortex causes motor coordination dysfunction in a model of white matter injury in neonatal rats. *Neurochemical research*, 43(1), 136-146, 2018.
- VAN OOIJEN MW, HEEREN A, SMULDERS K, GEURTS ACH, JANSSEN TWJ, BEE K PJ, WEERDESTEYN V, ROERDINK M. Improved gait adjustments after gait adaptability training are associated with reduced attentional demands in persons with stroke. *Experimental Brain Research* 233:1007-1018, 2015.
- VASUDEVAN, E. V., TORRES-OVIEDO, G., MORTON, S. M., YANG, J. F., BASTIAN, A. J. Younger is not always better: development of locomotor adaptation from childhood to adulthood. *Journal of neuroscience*, 31(8), 3055-3065, 2011.
- VOLOSHINA, A. S., KUO, A. D., DALEY, M. A., FERRIS, D. P. Biomechanics and energetics of walking on uneven terrain. *Journal of Experimental Biology*, 216(21), 3963-3970.
- WALLACE, J. E., KRAUTER, E. E., & CAMPBELL, B. A. Motor and reflexive behavior in the aging rat. *Journal of gerontology*, 35(3), 364-370. 1980, 2013.
- WEARICK-SILVA, L. E., ORSO, R., MARTINS, L. A., CREUTZBERG, K. C., CENTENO-SILVA, A., XAVIER, L. L., MESTRINER, R. G. Dual influences of early life stress induced by limited bedding on walking adaptability and Bdnf/TrkB and Drd1/Drd2 gene expression in different mouse brain regions. *Behavioural Brain Research* 2018.
- WOLPERT, D. M., LANDY, M. S. Motor control is decision-making. Current opinion in neurobiology, 22(6), 996-1003. 2012.
- WOLPERT, D. M., DIEDRICHSEN, J., FLANAGAN, J. R. Principles of sensorimotor learning. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(12), 739. 2011.
- YOGEV-SELIGMANN, G., HAUSDORFF, J. M., GILADI, N. The role of executive function and attention in gait. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 23(3), 329-342, 2008.
- YOUNG, J. W., JENTSCH, J. D., BUSSEY, T. J., WALLACE, T. L., HUTCHESON, D. M. Consideration of species differences in developing novel molecules as cognition enhancers. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(9), 2181-2193, 2013.

ANEXOS

ANEXO 1- APROVAÇÕES DAS COMISSÕES CIENTÍFICAS PARA OS PROJETOS ORIGINAIS



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS



Código SIPESQ: 6222

Porto Alegre, 10 de março de 2015.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE BIOCÊNCIAS da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "DESEMPENHO SENSORIO-MOTOR E MORFOLOGIA ASTROGLIAL EM UM MODELO DE ESTRESSE PÓS-TRAUMÁTICO: EFEITOS DO TRATAMENTO COM CETAMINA E DA EXTINÇÃO DO MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO" coordenado por REGIS GEMERASCA MESTRINER. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE BIOCÊNCIAS



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7665

Porto Alegre, 6 de dezembro de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica do FAC. ENFERMAGEM, NUTRICAÇÃO E FISIOTERAPIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE PRECOCE SOBRE O SISTEMA NEUROENDÓCRINO E O DESENVOLVIMENTO SENSORIO-MOTOR DA MARCHA EM UM MODELO MURINO". Este projeto necessita da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica do FAC. ENFERMAGEM, NUTRICAÇÃO E FISIOTERAPIA

Nota: Por se tratar de uma análise secundária de dados (vídeos) dos projetos originais mencionados, não há exigência legal de nova apresentação de projeto ao CEUA-PUCRS. Além disso, fomos informados pela Diretoria de Pesquisa que não cabe às Comissões Científicas avaliar mérito científico de trabalhos *a posteriori*. Portanto, como o trabalho já foi feito, sem ferir a legislação nacional vigente, os resultados da presente investigação não precisam ser reavaliados pela Comissão Científica. Entretanto, os dados obtidos devem ser relacionados como um resultado derivado dos projetos originais, que estão devidamente avaliados e registrados no SIPESQ.

ANEXO 2- APROVAÇÕES DO CEUA



SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7665

Porto Alegre, 21 de dezembro de 2016

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "IMPACTO DA EXPOSIÇÃO AO ESTRESSE PRECOCE SOBRE O SISTEMA NEUROENDÓCRINO E O DESENVOLVIMENTO SENSORIO-MOTOR DA MARCHA EM UM MODELO MURINO" coordenado por REGIS GEMERASCA MESTRINER.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 21/12/2016 - 21/08/2017

| Nº de Animais | Espécie |
|----------------------|--------------|
| 64 | Mus Musculus |
| 16 | Mus Musculus |
| 8 | Mus Musculus |
| Total de Animais: 88 | |

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 19/2015 - CEUA

Porto Alegre, 24 de abril de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00442, intitulado **“Desempenho sensório-motor e morfologia astrogliar em um modelo de estresse pós-traumático: Efeitos do tratamento com cetamina e da extinção do medo condicionado ao contexto”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data. Contudo, sugerimos que o pesquisador responsável atente para dois itens do formulário unificado em submissões futuras:

- No item que contempla a certificação dos membros da equipe em relação ao manuseio dos animais, não devem ser informadas disciplinas que não tenham este papel, tampouco treinam o usuário em relação à experimentação animal.
- Em relação à quarentena e aclimação, recomendamos que os pesquisadores incluam um período de aclimação após o transporte dos animais. Dada a natureza das variáveis e métodos a serem empregados, o transporte dos animais pode impactar negativamente às variáveis neurocomportamentais.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO 3- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

 Journal of the Experimental Analysis of Behavior

 Home

 Author

 Review

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to Journal of the Experimental Analysis of Behavior

Manuscript ID JEAB-2020-0035

Title The ladder rung walking test: a reliable method to study walking adaptability in rodents

Authors Martins, Lucas
Schiavo, Aniuska
Xavier, Léder
Mestriner, Régis

Date Submitted 08-Apr-2020



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br