

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Stephanie Naomi Funo de Souza

Avaliação dos efeitos comportamentais, histopatológicos e imunoistoquímicos resultantes da obstrução de derivação ventrículo-subcutânea na hidrocefalia induzida por caulim em ratos

Ribeirão Preto
2023

Stephanie Naomi Funo de Souza

Avaliação dos efeitos comportamentais, histopatológicos e imunoistoquímicos resultantes da obstrução de derivação ventrículo-subcutânea na hidrocefalia induzida por caulim em ratos

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina (Clínica Cirúrgica).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Volpon Santos

Departamento de Cirurgia e Anatomia

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Ribeirão Preto - SP
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

de Souza, Stephanie Naomi Funo

Avaliação dos efeitos comportamentais, histopatológicos e imunoistoquímicos resultantes da obstrução de derivação ventrículo-subcutânea na hidrocefalia induzida por caulim em ratos

113 p.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Volpon Santos, Marcelo

1. Derivação ventrículo-subcutânea 2. Hidrocefalia
3. Imunoistoquímica 4. Obstrução

FOLHA DE APROVAÇÃO

Stephanie Naomi Funo de Souza: **“Avaliação dos efeitos comportamentais, histopatológicos e imunoistoquímicos resultantes da obstrução de derivação ventrículo-subcutânea na hidrocefalia induzida por caulim em ratos”**

Tese apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina (Clínica Cirúrgica).

Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Volpon Santos

Aprovado em: __/__/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial minha mãe, Helena Mayumi Funo, que não só me proporcionou todos os meios para que eu chegasse até aqui, mas me apoia incondicionalmente em todas as minhas escolhas e me auxilia em todas as minhas lutas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu companheiro Fernando, por sempre estar ao meu lado, nos melhores e nos piores momentos. Obrigada, por tudo.

Aos meus professores Dr. Helio Rubens Machado e Dr. Marcelo Volpon Santos, sem os quais eu não teria completado essa trajetória. Obrigada pelos ensinamentos hoje e sempre.

À professora Luiza da Silva Lopes, que tanto me ajudou em todo processo. Obrigada pela paciência.

Aos meus amigos, que me acompanharam ao longo dessa jornada.

Aos meus companheiros de laboratório, Pamella, Stephanya e Maurício, por toda ajuda que me proporcionaram. Sem vocês esse trabalho não teria sido realizado.

Ao colega Sr. Davi Casale Aragon, pela ajuda na realização dos testes estatísticos, essenciais nesse trabalho.

À CAPES – o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

RESUMO

DE SOUZA, SNF. **Avaliação dos efeitos comportamentais, histopatológicos e imunoistoquímicos resultantes da obstrução de derivação ventrículo-subcutânea na hidrocefalia induzida por caulim em ratos.** 2023. 113 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Introdução. A hidrocefalia é uma doença cerebral prevalente na população pediátrica que apresenta fisiopatologia complexa e múltiplas etiologias, afetando diversas regiões do sistema nervoso e com potencial de causar sequelas graves e irreversíveis. O tratamento mais comumente preconizado é a realização de derivação ventricular (shunt), cuja complicação mais frequente é a obstrução mecânica porém cujos efeitos patológicos são pouco conhecidos. **Objetivos.** Avaliação e comparação de aspectos clínicos (ganho ponderal, comportamento motor e memória), histopatológicos e imunoistoquímicos (astrocitose reativa, inflamação e lesão neuronal) na fase aguda da hidrocefalia experimental induzida por caulim, após tratamento com derivação adaptada (ventrículo-subcutânea) e após obstrução da derivação. **Materiais e métodos.** Foram utilizados ratos Wistar com 7 dias de vida, divididos em 4 grupos: grupo controle sem injeção de caulim (n = 6), hidrocefálico não tratado (n=5), hidrocefálico tratado com derivação ventrículo subcutânea (DVSC) (n=7), e hidrocefálico tratado com *shunt* obstruído (n=5). Os animais foram pesados diariamente e análise comportamental foi feita utilizando os testes de mobilidade em campo aberto e labirinto aquático de Morris. Os ratos foram sacrificados com 28 dias de vida e foram realizadas análises histológicas dos encéfalos com hematoxilina/eosina e luxol *fast blue*, além de análises imunoistoquímicas para GFAP, COX-2, Neu-N e Caspase-3 para avaliação da astrocitose reativa, inflamação, marcação neuronal e atividade apoptótica, respectivamente. **Resultados:** O grupo com obstrução da derivação teve menor ganho de peso e pior desempenho nos testes comportamentais. A astrocitose reativa foi mais evidente no grupo HTOT, assim como a resposta inflamatória na porção anterior do encéfalo. Não houve diferença na densidade de células apoptóticas; O grupo hidrocefálico teve a menor taxa de células neuronais com relação aos demais grupos. **Conclusões:** A obstrução da derivação resulta em prejuízo no desempenho dos testes comportamentais e acarreta alterações histopatológicas irreversíveis quando comparadas aos achados no grupo com hidrocefalia tratada, mesmo após a desobstrução do sistema. O modelo desenvolvido é factível e eficiente em simular o contexto clínico da disfunção de um shunt.

Palavras-chave: Derivação ventrículo-subcutânea. Hidrocefalia. Imunoistoquímica. Obstrução

ABSTRACT

DE SOUZA, SNF. **Evaluation of the behavioral, histopathological and immunohistochemical effects resulting from ventriculosubcutaneous shunt obstruction in kaolin-induced hydrocephalus in rats.** 2023. 113 p. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Introduction. Hydrocephalus is a brain disease prevalent in the pediatric population with a complex pathophysiology and multiple etiologies, affecting different regions of the nervous system and with the potential to cause serious and irreversible sequelae. The most commonly recommended treatment is ventricular shunting. The most frequent complication is mechanical obstruction, and its pathological effects are still unknown. **Objectives.** Evaluation and comparison of clinical aspects (weight gain, motor behavior and memory), histopathological and immunohistochemical aspects (reactive astrocytosis, inflammation and neuronal injury) in the acute phase of experimental hydrocephalus induced by kaolin, after treatment with adapted shunt (ventriculo-subcutaneous) and after shunt obstruction. **Materials and methods.** Wistar rats aged 7 days were used, divided into 4 groups: control group without kaolin injection (n = 6), untreated hydrocephalic group (n = 5), hydrocephalic group treated with subcutaneous ventriculoshunt (DVSC) (n = 7), and hydrocephalic treated with shunt, posteriorly obstructed (n=5). The animals were weighed daily and behavioral analysis was performed using the open field mobility tests and the Morris water maze. The rats were sacrificed at 28 days of age and histological analysis of the brains were performed with hematoxylin/eosin and Luxol fast blue, in addition to immunohistochemical analyzes for GFAP, COX-2, Neu-N and Caspase-3 to evaluate reactive astrocytosis, inflammation, neuronal labeling and apoptotic activity, respectively. **Results:** The group with shunt obstruction had less weight gain and worse performance in behavioral tests. Reactive astrocytosis was more evident in the HTOT group, as was the inflammatory response in the anterior portion of the brain. There was no difference in the density of apoptotic cells; The hydrocephalic group had the lowest rate of neuronal cells in relation to the other groups. **Conclusions:** Obstruction of the shunt results in impaired performance of behavioral tests and causes irreversible histopathological changes when compared to findings in the group with treated

hydrocephalus, even after unblocking the system. The developed model is feasible and efficient in simulating the clinical context of shunt dysfunction.

Keywords: Ventriculo-subcutaneous shunt. Hydrocephalus. Immunohistochemistry. Obstruction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comparação entre espécimes anatômicos e imagens ultrassonográficas. Em a (peça anatômica) e c (ultrassonografia) são vistos cortes coronais de animal controle (rato sem hidrocefalia. Em b (peça anatômica) e d (ultrassonografia), corte coronal em modelo de rato com hidrocefalia induzida por Caulim. Modificado de: SILVA et al., 2016.....	27
Figura 2 - Fluxograma das etapas do estudo.....	32
Figura 3 – Representação iconográfica sequencial da técnica de derivação ventrículo-subcutânea num rato Wistar de sete dias de vida. (A) Preparação e raspagem dos pelos da cabeça; (B) Incisão cutânea com pequeno bisturi número 15; (C) Tunelização do cateter distal; (D) Burr-hole com drill de 1mm de diâmetro; (E) Punção ventricular; (F) Uma gota de cola de cianoacrilato é colocada para selar a perfuração craniana e evitar migração do cateter; (G) Síntese da pele; (H) Outra gota de cola de cianoacrilato é colocada sobre a incisão cutânea. Fonte: SANTOS, 2016.....	34
Figura 4 - Representação do cateter utilizado para derivação ventrículo-subcutânea e do liga-clipe utilizado para seu clampeamento. A imagem à direita mostra a oclusão do cateter distal.....	35
Figura 5 - Animal durante avaliação no teste de campo aberto. O círculo desenhado na plataforma foi considerado como parâmetro para análise dos vídeos em relação ao tempo de permanência na “borda” ou “centro”.....	37
Figura 6: Animal durante treino do teste do labirinto aquático: a seta e o círculo representam o local onde será posicionada a plataforma. Estão representados os referenciais utilizados durante a realização do teste (Norte, Sul, Leste e Oeste).	38
Figura 7: Representação da realização da Ultrassonografia em ratos. Adaptado de LOPES et. al., 2021. .	40
Figura 8: Série ultrassonográfica de animal do grupo HTOT. A-E: imediatamente antes da realização da DVSC; B-F: imediatamente antes da obstrução da DVSC; C-G: imediatamente antes da desobstrução da DVSC; D-H: imediatamente antes da eutanásia. Nota-se acentuada diminuição da dilatação após o tratamento ventricular após a realização da DVSC. Após sua obstrução pode-se observar novo aumento das dimensões ventriculares, com nova redução após desobstrução do sistema.....	40
Figura 9 – Gráfico: Média do ganho de peso de cada grupo estudado. Controle – animais sem hidrocefalia; HNT – animais com hidrocefalia não tratada; HTD – animais hidrocefálicos tratados com derivação ventrículo-subcutânea (DVSC); HTOT – animais hidrocefálicos tratados que tiveram o sistema ocluído e posteriormente desobstruído. O grupo HTOT teve a menor taxa de ganho de peso entre todos os grupos.....	45
Figura 10 - Gráfico: Médias de tempo de permanência nas bordas dos diferentes grupos, em P6, P16 e P20. O grupo HTOT permaneceu mais tempo nas bordas em comparação aos grupos controle e HT em P20 e P16, respectivamente.....	47
Figura 11 - Gráfico : Médias de tempo de permanência no centro dos diferentes grupos, em P6, P16 e P20. Resultados são inversos aos encontrados na análise de permanência nas bordas. Pode-se notar maior tendência de permanência no centro pelos animais do grupo controle.	48
Figura 12 - Gráfico: Médias de tempo de exploração vertical, em P6, P16 e P20. O grupo HTOT teve o menor tempo de exploração vertical a partir de P16.	50
Figura 13 - Gráfico: Médias de tempo em grooming, em P6, P16 e P20. O grupo controle permanece mais tempo em grooming em comparação aos demais grupos, sendo significativa essa diferença apenas em P20 quando em comparação aos grupos HNT e HTD.....	51

Figura 14 – Gráfico: Progressão da marcha de cada grupo, ao longo dos períodos considerados (1 corresponde a P6 – 8 corresponde a P20)	53
Figura 15 - Gráfico: Médias de tempo entre os diferentes grupos, nos diferentes períodos. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT1 – grupo hidrocefálico tratado, com shunt obstruído, primeira avaliação. Observa-se o melhor desempenho do grupo controle e o desempenho inferior do grupo HTOT em comparação aos demais grupos.	56
Figura 16 - Gráfico: Médias de tempo do grupo HTOT, nas duas avaliações realizadas. Observa-se a melhora do desempenho da memória após a desobstrução do sistema.	58
Figura 17 - Gráfico 9: Médias de tempo entre os diferentes grupos, nos diferentes períodos. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT1 – grupo hidrocefálico tratado, com shunt obstruído, segunda avaliação. Houve redução do tempo de chegada do grupo HTOT em comparação a sua primeira avaliação.	59
Figura 18 - Gráfico: Médias de tempo entre os diferentes grupos, nos diferentes períodos. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT1 – grupo hidrocefálico tratado, com shunt obstruído.	60
Figura 19 - Fotomicrografias do corpo caloso, coradas com hematoxilina-eosina. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado, com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	61
Figura 20 - Fotomicrografias da matriz germinativa, coradas com hematoxilina-eosina. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D – hidrocefálico tratado, com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	62
Figura 21 - Fotomicrografias do córtex adjacente ao corpo caloso, coradas com hematoxilina-eosina. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D – hidrocefálico tratado, com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	63
Figura 22 - Fotomicrografias do hipocampo, coradas com hematoxilina-eosina. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D – hidrocefálico tratado, com shunt obstruído. Magnificação de 4x.	64
Figura 23 - Fotomicrografias das subáreas do hipocampo, CA1, CA2, CA3 e giro denteado, representadas nas colunas, da esquerda para direita, coradas com hematoxilina-eosina. A1, A2, A3, A4 - grupo controle; B1, B2, B3, B4 - hidrocefálico não tratado; C1, C2, C3, C4 - hidrocefálico tratado e D1, D2, D3, D4 - hidrocefálico tratado com shunt obstruído.. Magnificação de 40x.	65
Figura 24 - Gráfico: Análise comparativa da média da espessura do corpo caloso entre os diferentes grupos (A) e da intensidade da marcação do corpo caloso (B). Pode-se observar a maior espessura do grupo controle em relação aos demais grupos.....	66
Figura 25 - Fotomicrografias do corpo caloso, corados com luxol fast blue. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D – hidrocefálico tratado, com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	67
Figura 26 - Gráfico: Análise da reação astrocitária no corpo caloso: A – média do número de astrócitos por mm ² em cada grupo. B – média do escore atribuído à intensidade da marcação em cada grupo. O grupo HTOT apresentou maior grau de reação astrocitária em comparação aos demais grupos.....	68
Figura 27 - Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP no corpo caloso. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x. Nota-se a evidente reação astrocitária nos grupos HTD e HTOT.	69

Figura 28 - Gráfico: Análise da reação astrocitária na matriz germinativa: A – média do número de astrócitos por mm ² em cada grupo. B – média do escore atribuído à intensidade da marcação em cada grupo.	70
Figura 29 - Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP na matriz germinativa. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	70
Figura 30 - Gráfico : Análise da reação astrocitária no córtex adjacente ao corpo caloso: A – média do número de astrócitos por mm ² em cada grupo. B – média do escore atribuído à intensidade da marcação em cada grupo.	71
Figura 31 - Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP no córtex adjacente ao corpo caloso. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	72
Figura 32 - Gráfico : Análise da reação astrocitária nas subáreas do hipocampo, CA1, CA2, CA3 e Giro denteado: A, C, E, G – média do número de astrócitos por mm ² em cada grupo. B, D, F, H – média do escore atribuído à intensidade da marcação em cada grupo.	74
Figura 33 - Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP nas subáreas do hipocampo – CA1, CA2, CA3 e giro denteado, representadas nas colunas, da esquerda para direita. A1, A2, A3, A4 - grupo controle; B1, B2, B3, B4 - hidrocefálico não tratado; C1, C2, C3, C4 - hidrocefálico tratado e D1, D2, D3, D4 - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	74
Figura 34 - Gráfico : Análise da densidade celular das células com marcação para caspase: A – Média do número de células marcadas por mm ² no córtex dorsal ao corpo caloso. B – Média do número de células marcadas por mm ² no córtex dorsal ao hipocampo.	75
Figura 35 - Fotomicrografias da imunomarcção por Caspase no córtex dorsal ao corpo caloso (primeira linha) e no córtex dorsal ao hipocampo (segunda linha). A, E - grupo controle; B, F - hidrocefálico não tratado; C, G - hidrocefálico tratado e D, H - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	76
Figura 36 - Gráfico: Análise da porcentagem de células com imunomarcção para COX-2 no corpo caloso (A) e na matriz germinativa (B).	77
Figura 37 - Fotomicrografias da imunomarcção por COX-2 no corpo caloso. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	77
Figura 38 - Fotomicrografias da imunomarcção por COX-2 na matriz germinativa. A - Grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	78
Figura 39 - Gráfico: Análise da porcentagem de células com imunomarcção para COX-2 no córtex adjacente ao corpo caloso (A) e no córtex adjacente ao hipocampo (B).	79
Figura 40 - Fotomicrografias da imunomarcção por COX-2 no córtex dorsal ao corpo caloso (primeira linha) e no córtex dorsal ao hipocampo (segunda linha). A - Grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	79
Figura 41 - Gráfico: Análise da porcentagem de células com imunomarcção para COX-2 nas subáreas do hipocampo: A – CA1. B – CA2. C – CA3. D – Giro denteado.	80
Figura 42 - Fotomicrografias da imunomarcção por COX-2 nas subáreas do hipocampo – CA1, CA2, CA3, e giro denteado, representadas nas colunas, da esquerda para direita. A1, A2, A3, A4 - Grupo	

controle; B1, B2, B3, B4 - hidrocefálico não tratado; C1, C2, C3, C4 - hidrocefálico tratado e D1, D2, D3, D4 - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	81
Figura 43 - Gráfico: Análise da densidade celular das células com marcação para Neu-N: A – Média do número de células marcadas por mm ² no córtex dorsal ao corpo caloso. B – Média do número de células marcadas por mm ² no córtex dorsal ao hipocampo.	82
Figura 44 - Gráfico: Análise da porcentagem de células com imunomarcção para Neu-N nas diferentes regiões do encéfalo: A – Córtex dorsal ao corpo caloso. B – Córtex dorsal ao hipocampo.	83
Figura 45 - Fotomicrografias da imunomarcção por Neu-N no córtex dorsal ao corpo caloso (primeira linha) e no córtex dorsal ao hipocampo (segunda linha). A,E - Grupo controle; B,F - hidrocefálico não tratado; C,G - hidrocefálico tratado e D,H - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	83
Figura 46 - Gráfico: Análise da densidade celular (média do número de células marcadas por mm ²) das células com marcação para Neu-N nas subáreas do hipocampo: A – CA1. B – CA2. C – CA3. D – Giro denteado.	84
Figura 47 - Gráfico: Análise da porcentagem de células com imunomarcção para Neu-N nas subáreas do hipocampo: A – CA1. B – CA2. C – CA3. D – Giro denteado.	85
Figura 48 - Fotomicrografias da imunomarcção por Neu-N nas subáreas do hipocampo – CA1, CA2, CA3 e GD, representados nas colunas, respectivamente, da esquerda para a direita. A1, A2, A3, A4 - Grupo controle; B1, B2, B3, B4 - hidrocefálico não tratado; C1, C2, C3, C4 - hidrocefálico tratado e D1, D2, D3, D4 - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média do ganho de peso entre os diferentes grupos. Pode-se observar que o grupo HTOT apresenta ganho de peso inferior aos demais grupos	46
Tabela 2 – Média da diferença de ganho de peso entre os diferentes grupos.....	46
Tabela 3 - Comparação estatística das médias de tempo de permanência na borda entre os diferentes grupos, nos três períodos considerados (P6, P16 e P20).	47
Tabela 4 - Comparação estatística das médias de tempo de permanência no centro entre os diferentes grupos, nos três períodos considerados (P6,P16 e P20).	49
Tabela 5 – Comparação estatística das médias de tempo de exploração vertical entre os diferentes grupos, nos três períodos considerados (P6,P16 e P20).....	50
Tabela 6 - Comparação estatística das médias de tempo de exploração vertical entre os diferentes grupos, nos três períodos considerados (P6,P16 e P20).....	51
Tabela 7 - Mediana do Escore de cada grupo, em cada período avaliado.....	52
Tabela 8 – Média do intervalo de tempo necessário para atingir a plataforma entre os diferentes grupos e na segunda avaliação do grupo HTOT. M1 – período matutino do primeiro dia; T1 – período vespertino do primeiro dia; M2 – período matutino do segundo dia; e T2 – período vespertino do segundo dia.....	54
Tabela 9 – Comparação estatística do desempenho dos animais dentro do mesmo grupo, em diferentes períodos. M1, T1, M2 e T2 correspondem aos períodos matutino e vespertino de P15 e P16, respectivamente. M1', T1', M2' e T2' correspondem aos períodos matutino e vespertino de P19 e P20, respectivamente.....	55
Tabela 10 – Comparação estatística dos desempenhos entre os diferentes grupos, em cada período. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT1 – grupo hidrocefálico tratado, com shunt obstruído, primeira avaliação.	57
Tabela 11 - Comparação estatística da diferença de desempenho do grupo HTOT entre a primeira (realizadas no P15 e P16) e a segunda (realizadas no P19 e P20) avaliações.	58
Tabela 12 –Comparação estatística dos desempenhos entre os diferentes grupos, em cada período. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT2 – grupo hidrocefálico tratado, com shunt obstruído, segunda avaliação (após desobstrução).....	59

SUMÁRIO

1	Introdução	18
1.1	Hidrocefalia	18
1.1.1	Definição e Epidemiologia	18
1.1.2	Dinâmica do LCR, Classificação e Fisiopatologia	18
1.1.3	Diagnóstico e Tratamento	20
1.1.4	Complicações do tratamento	22
1.2	Histopatologia	22
1.2.1	Alterações histopatológicas na hidrocefalia	22
1.2.1	Achados histopatológicos após tratamento da hidrocefalia	24
1.3	Hidrocefalia Experimental	25
1.3.1	Modelo de hidrocefalia em ratos	25
1.3.2	Tratamento da hidrocefalia por derivação ventrículo-subcutânea	25
1.3.3	Ultrassonografia	26
2	Justificativa	28
3	Objetivos	29
3.1	Gerais	29
3.2	Específicos	29
4	Materiais e Métodos	30
4.1	Desenho do estudo	30
4.2	Amostragem e Grupos experimentais	30
4.3	Indução da hidrocefalia	32
4.4	Implante da derivação liquórica ventrículo-subcutânea (DVSC)	33
4.5	Oclusão e revisão do sistema de derivação ventrículo-subcutânea	34
4.6	Estudos comportamentais	36
4.6.1	Teste do campo aberto (<i>Open Field</i>)	36
4.6.2	Teste do labirinto aquático de Morris (<i>Water Maze</i>)	37
4.7	Estudo ultrassonográfico	39
4.8	Técnica de coleta e preparação do tecido cerebral	40
4.9	Histologia e imunoistoquímica	41
5	Análise estatística	44

6 Resultados	45
6.1 Peso	45
6.2 Avaliação comportamental	46
6.2.1 Teste de campo aberto (<i>Open Field</i>)	46
6.2.1.1 Tempo nas bordas	46
6.2.1.2 Tempo no centro	47
6.2.1.3 Exploração vertical	49
6.2.1.4 <i>Grooming</i>	51
6.2.1.5 Avaliação da marcha e do comportamento	52
6.2.2 Labirinto aquático de Morris (<i>Watermaze</i>)	53
6.3 Avaliações histológicas	60
6.3.1 Coloração por Hematoxilina-eosina	60
6.3.2 Análise por <i>luxol fast blue</i> – LFB	65
6.4 Análises imunoistoquímicas	67
6.4.2 Avaliação imunoistoquímica por GFAP	67
6.4.3 Avaliação imunoistoquímica por Caspase-3	75
6.4.4 Avaliação imunoistoquímica por COX-2	76
6.4.5 Avaliação imunoistoquímica por Neu-N	81
7 Discussão	87
8 Conclusão	104
9 Referências	106
10 Anexos	113
10.1 Aprovação pela Comissão de Ética no Uso em Animais	113

Introdução

1.1 Hidrocefalia

1.1.1 Definição e Epidemiologia

A hidrocefalia pode ser definida como aumento das dimensões dos ventrículos cerebrais secundária a uma anormalidade da produção, circulação ou reabsorção do líquido cefalorraquidiano (LCR) (WILLIAMS *et al.*, 2007). Trata-se de doença complexa, de múltiplas fisiopatologias possíveis mesmo em um único paciente, apresentando mecanismos patogênicos e compensatórios que interagem de maneira variável ao longo do tempo (DI ROCCO; FRASSANITO, 2020).

É a doença cerebral mais comum em crianças e está entre as entidades mais comumente tratadas por neurocirurgiões. Estima-se que a incidência global da doença seja de 383 casos a cada 100.000 nascidos vivos, podendo estar associada a uma grande variedade de etiologias (DEWAN *et al.*, 2019). Apesar de se caracterizar como doença típica da faixa etária pediátrica, pode ocorrer também em adolescentes, adultos e idosos (WARF, 2019).

Em crianças, a maioria dos casos se apresenta ao nascimento ou logo após esse período, estando associada a etiologias como estenose de aqueduto, malformação de Dandy-Walker, holoprosencefalia, e defeitos de fechamento do tubo neural (JAMIL; KESTLE, 2016). Outras causas incluem hemorragias, infecções do sistema nervoso, traumatismo cranioencefálico e tumores do sistema nervoso central (DEL BIGIO; ZHANG, 1998; DEL BIGIO *et al.*, 2003).

1.1.2 Dinâmica do LCR, Classificação e Fisiopatologia

O modelo clássico da dinâmica liquórica baseia-se na teoria da circulação do líquido (LCR), em que o mesmo seria produzido majoritariamente pelos plexos coróides, circularia em sentido unidirecional rostro-caudal entre as cavidades ventriculares e posteriormente passaria ao espaço subaracnóideo através de orifícios de saída no quarto ventrículo, sendo estes os únicos meios de comunicação entre o sistema ventricular e o espaço subaracnóideo. A partir deste ponto, o líquido seria então absorvido pelas granulações aracnóides para os sistemas venosos. Atualmente sabe-se também que os espaços perivasculares cerebrais e canais linfáticos associados aos nervos cranianos e espinais contribuem com a drenagem liquórica (DEL BIGIO, 2010; OSBORN *et al.*, 2018).

Simplificadamente, os ventrículos cerebrais e o espaço subaracnóideo representam uma série de canais interligados por estreitos orifícios sujeitos a obstrução, incluindo o forame interventricular (de Monro), aqueduto mesencefálico (de Sylvius), forames mediano e laterais do quarto ventrículo (de Magendie e Lushka) e granulações aracnoides (NAGRA; DEL BIGIO, 2018).

Além da proteção cerebral contra o choque, o líquido tem a função de excretar substâncias potencialmente tóxicas produzidas pelo metabolismo cerebral e agir como meio de comunicação molecular e de transporte de fatores tróficos (DEL BIGIO, 2010).

A classificação proposta por Dandy em 1913, dividindo a hidrocefalia em “comunicante” e “não comunicante”, foi baseada nos achados de estudos experimentais em animais que consistiam na injeção de contraste nas cavidades ventriculares e na sua identificação no líquido adquirido através de punções lombares, comprovando então a comunicação existente entre os ventrículos e o espaço subaracnóideo (REKATE, 2009,2011). Os termos “obstrutivo” e “não obstrutivo”, apesar de inexatos, são comumente utilizados como sinônimo de “não comunicante” e “comunicante”, respectivamente. Devido aos mecanismos fisiopatológicos diversos, a classificação da hidrocefalia é motivo de debate até os dias atuais (OI; ROCCO, 2006). Mesmo nas hidrocefalias ditas comunicantes, em que não se visualiza componente obstrutivo evidente nos orifícios de drenagem líquórica dos ventrículos, pode haver obstrução no nível das granulações aracnoides (OI; ROCCO 2006; OSBORN *et al.*, 2018).

A hidrocefalia é uma doença multifatorial e seus mecanismos fisiopatológicos ainda não são totalmente conhecidos (MCALLISTER *et al.*, 2016). Vários processos patológicos estão envolvidos na alteração da dinâmica líquórica e gênese da hidrocefalia, sendo difícil a realização de estudos que permitam a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos individualmente. Entretanto, é possível distinguir a existência de mecanismos primários ou causais e lesões secundárias à ventriculomegalia. Causas primárias incluem, basicamente, as malformações cerebrais, que resultam na hidrocefalia congênita, e patologias como hemorragia intraventricular, subaracnóidea ou intraparenquimatosa, infecções do sistema nervoso e tumores cerebrais (JAMIL; KESTLE, 2016; MCALLISTER, 2012; NAGRA; DEL BIGIO, 2018).

Diversos mecanismos secundários foram descritos, incluindo desde lesão axonal direta por efeito mecânico da ventriculomegalia até desmielinização, morte celular, alterações metabólicas e nos neurotransmissores, resultantes da alteração do fluxo sanguíneo regional (MCALLISTER *et al.*, 2016).

A hidrocefalia tem efeitos deletérios no cérebro e o grau da lesão depende da magnitude, da velocidade de instalação e da duração da ventriculomegalia, além de ser afetada pela idade em que a doença foi instalada (DEL BIGIO, 2006, 2010). A ventriculomegalia pode prejudicar o desenvolvimento cerebral durante a fase de maior proliferação celular, que ocorre até a 34ª semana de gestação, afetando, portanto, pacientes com hidrocefalia congênita ou pacientes prematuros que desenvolvem a doença no período perinatal (NAGRA, 2018). Quando ocorre em crianças ao longo do primeiro ano de vida, período em que ocorre grande crescimento cerebral, a hidrocefalia pode retardar o processo de mielinização e sinaptogênese (DEL BIGIO, 2010; NAGRA, 2018).

1.1.3 Diagnóstico e Tratamento

O diagnóstico da hidrocefalia é baseado em aspectos clínicos e radiológicos. Os sintomas apresentados por pacientes pediátricos são, em sua maioria, decorrentes de hipertensão intracraniana e variam de acordo com a idade. Em lactentes, com fontanelas e suturas abertas, os sinais incluem aumento anormal do perímetro cefálico, irritação, vômitos e alterações da movimentação ocular. Em crianças mais velhas, os sintomas mais precoces incluem cefaleia, náuseas e vômitos.

A investigação por imagem pode ser realizada através da Ultrassonografia Transfontanelar (USGTF), Tomografia de Crânio (TC) e Ressonância Magnética de Encéfalo (RM) (JAMIL; KESTLE, 2016).

A tomografia de crânio é uma ferramenta que permite o diagnóstico, seguimento e avaliação das complicações do tratamento da hidrocefalia. É um exame confiável, acessível, compatível com dispositivos de suporte avançado de vida e de rápida realização, dispensando a realização da sedação na grande maioria dos casos. Sua principal desvantagem consiste no uso da radiação ionizante para aquisição das imagens, limitando seu uso especialmente em pacientes pediátricos. A ressonância magnética de encéfalo é o exame de escolha para avaliação da dilatação ventricular e identificação da causa da hidrocefalia. O exame fornece informações detalhadas das características anatômicas do encéfalo, além de permitir estudo do fluxo liquorico através dos ventrículos. (DINÇER; ÖZEK, 2011; SALEH *et al.*, 2017). Seu uso torna-se limitado devido ao custo elevado, baixa disponibilidade, e demora para aquisição das imagens, sendo necessária sedação para realização do exame em pacientes pediátricos. (OLIVEIRA; MACHADO, 2003). Apesar de a TC e a RM serem exames frequentemente necessários na investigação da hidrocefalia,

sua indicação deve sempre levar em consideração aspectos médicos, econômicos e logísticos (OLIVEIRA; MACHADO, 2003).

A USGTF, por sua vez, consiste em um método útil para diagnóstico e acompanhamento da hidrocefalia em crianças com fontanela anterior aberta, permitindo a visualização do tamanho e da forma dos ventrículos laterais (DINÇER; ÖZEK, 2011). O exame pode ser realizado à beira do leito, de maneira rápida, indolor, sem necessidade de sedação nem exposição à radiação, além de permitir a avaliação da progressão da ventriculomegalia (OLIVEIRA; MACHADO, 2003; DINÇER; ÖZEK, 2011). Entretanto, existem limitações para avaliação do terceiro e quarto ventrículos e do espaço subaracnóideo, além de ser um exame examinador-dependente, o que pode comprometer o seguimento e avaliação seriada da ventriculomegalia (DINÇER; ÖZEK, 2011).

Os achados da USGTF incluem a dilatação dos ventrículos laterais e do terceiro ventrículo, apagamento dos sulcos cerebrais e edema transependimário, este último sendo mais associado a casos de hidrocefalia aguda (CHAKRABORTY *et al.*, 2012). A associação do estudo com Doppler transcraniano permite a análise do fluxo sanguíneo nos grandes vasos cerebrais e da morfologia da curva de velocidade, possibilitando uma avaliação indireta da pressão intracraniana (OLIVEIRA; MACHADO, 2003).

O tratamento da hidrocefalia é cirúrgico. Apesar dos avanços da neuroendoscopia no tratamento da doença, o uso das derivações ventriculares ou '*shunts*' ainda é o tratamento preconizado para a grande maioria dos pacientes e consiste no desvio do fluxo líquórico para outras cavidades do corpo através de um cateter, sendo a mais utilizada a derivação ventriculoperitoneal (DEL BIGIO, 2001; JAMIL; KESTLE, 2016).

Apesar da evolução dos dispositivos destinados ao tratamento da doença, as taxas de mau funcionamento dos *shunts* podem chegar a 30-40% ao longo do primeiro ano de tratamento e superar 50% no segundo ano, contribuindo sobremaneira para a alta morbidade relacionada à hidrocefalia (HANAK *et al.*, 2017; MCALLISTER, 2012).

Somado à elevada taxa de mau funcionamento dos *shunts*, a ventriculomegalia que se desenvolve em cérebros imaturos de fetos e neonatos pode resultar em lesões celulares irreversíveis. A prevalência de déficits neurológicos residuais em pacientes portadores de hidrocefalia congênita ou neonatal tratada varia de 28-78% (HANAK *et al.*, 2017; MCALLISTER, 2012).

1.1.4 Complicações do tratamento

Conforme explicitado anteriormente, as taxas de mau funcionamento dos *shunts* são elevadas mesmo com os avanços no tratamento da hidrocefalia alcançados até os dias atuais. Em termos gerais, define-se como mau funcionamento qualquer situação em que seja necessária realização de procedimento cirúrgico para exploração ou troca do *shunt*. As principais causas incluem obstrução, infecção, defeitos mecânicos (fratura ou desconexão do sistema), e hiperdrenagem (HANAK *et al.*, 2017). A obstrução do sistema de derivação é a causa mais comum de mau funcionamento dos *shunts*, podendo ocorrer em qualquer ponto do sistema: cateter proximal (ventricular), válvula ou cateter distal. (HANAK *et al.*, 2017; PAFF *et al.*, 2018).

1.2 Histopatologia

1.2.1 Alterações histopatológicas na hidrocefalia

O dano cerebral secundário à hidrocefalia ocorre em diversos territórios encefálicos. O conhecimento das alterações funcionais e morfológicas do tecido neural em cérebros hidrocefálicos provém, principalmente, de diversos estudos utilizando modelos animais, considerando a similaridade histopatológica existente com espécimes humanos (DEL BIGIO, 2006).

As lesões no sistema nervoso causadas pela hidrocefalia variam em magnitude nas diferentes regiões cerebrais. A substância branca periventricular é o local onde o dano cerebral é mais acentuado, sendo bem estabelecidos alguns dos mecanismos primários e secundários que atuam nesse processo. A ventriculomegalia *per se* causa lesão mecânica direta por estiramento das fibras axonais. Secundariamente, ocorre redução da rede de capilares na substância branca periventricular, com conseqüente redução do fluxo sanguíneo local, levando a ativação da cascata oxidativa e processos proteolíticos, resultando em destruição axonal e alterações metabólicas que afetam a funcionalidade neuronal (NAGRA; DEL BIGIO, 2018).

Autópsias realizadas em pacientes hidrocefálicos evidenciaram afilamento do corpo caloso e fórnice associado a atrofia da substância branca periventricular, achados que podem estar associados aos déficits motores e cognitivos apresentados por estes pacientes (NAGRA; DEL BIGIO, 2018). Além disso, a diminuição do fluxo sanguíneo periventricular altera a dinâmica do

fluido extracelular, comprometendo a extração de substâncias potencialmente tóxicas que se acumulam no líquido e tecido cerebral (DEL BIGIO, 2010; NAGRA; DEL BIGIO, 2018).

Diversos estudos demonstraram graus variados de perda da camada endimária ventricular, comprometendo, então, a barreira existente entre o tecido cerebral e o líquido, função exercida pelas células do epitélio ciliar endimário. Essas alterações ocorrem como efeito destrutivo direto do estiramento das paredes ventriculares e incapacidade de regeneração das células endimárias (NAGRA; DEL BIGIO, 2018).

Em casos de ventriculomegalia grave pode ocorrer redução da espessura cortical decorrente de dano axonal. Crianças hidrocefálicas podem também apresentar polimicrogiria pelo desdobração anormal da parte profunda dos sulcos cerebrais em direção à superfície cerebral. Entretanto, as alterações morfológicas corticais são sutis em comparação com as lesões que acometem a substância branca periventricular. A preservação do córtex cerebral em pacientes com hidrocefalia tratada poderia explicar o porquê de parte destes pacientes apresentarem inteligência dentro da faixa da normalidade, apesar da presença de alterações de comportamento e déficits motores associados (HOPPE-HIRSCH *et al.*, 1998; AOYAMA *et al.*, 2006).

Diversos estudos demonstraram alterações citomorfológicas nos neurônios corticais, como irregularidades e varicosidades nos dendritos, núcleos picnóticos e presença de células piramidais imaturas, e edema do neurópilo. Aoyama e colaboradores, utilizando técnicas de imunistoquímica em cérebros de cães hidrocefálicos, demonstraram que a ventriculomegalia poderia resultar em alterações dendríticas progressivas (AOYAMA *et al.*, 2006). Além disso, sendo a função cerebral determinada pela integridade, conectividade e funcionalidade dos neurônios, as alterações corticais acima descritas associadas à atividade anormal dos sistemas noradrenérgicos e dopaminérgicos, e da sinaptogênese, podem trazer prejuízo da funcionalidade neuronal (DEL BIGIO, 2006).

A gliose ocorre como resposta natural a danos causados ao cérebro. No caso da hidrocefalia, o estiramento e a compressão do tecido cerebral como resultado da ventriculomegalia podem induzir à proliferação de astrócitos e da micróglia. A proliferação astrogliar compõe a maior parte da substância branca reconstituída após tratamento da hidrocefalia, porém sua função no processo de regeneração axonal ainda é alvo de debate (AOYAMA *et al.*, 2006). Os astrócitos reativos são astrócitos submetidos à remodelação morfológica, molecular e funcional em resposta a lesões, doenças ou infecções do SNC. Estudos mostram que o aumento do número das células gliais pode inibir a recuperação do tecido cerebral (MILLER; MCALLISTER, 2007). Entretanto, células

astrogliais expressam fatores promotores de crescimento neurais que possuem papel importante na proteção dos neurônios e reconstituição do tecido nervoso lesado (AOYAMA *et al.*, 2006).

A hidrocefalia que surge no período neonatal pode causar supressão da proliferação celular na zona subependimária, local onde as células precursoras dos oligodendrócitos se desenvolvem na primeira semana pós-natal. Essa alteração na capacidade de proliferação pode resultar em perda permanente da capacidade de mielinização da substância branca, mesmo após tratamento da ventriculomegalia. Além disso, outros mecanismos podem resultar em necrose ou apoptose dos oligodendrócitos. A isquemia crônica, associada ao acúmulo de substâncias tóxicas no córtex cerebral, pode causar lesão direta a essas células, enquanto a lesão axonal, com consequente perda da conectividade celular, pode induzir à apoptose (DEL BIGIO; ZHANG, 1998; KHAN *et al.*, 2006).

1.2.1 Achados histopatológicos após tratamento da hidrocefalia

O manto cerebral é reconstituído após o tratamento da hidrocefalia, porém não se sabe o grau de recuperação funcional dos neurônios do ponto de vista clínico. Efeitos favoráveis do tratamento precoce da hidrocefalia foram descritos, como prevenção do defeito na sinaptogênese e do déficit de aprendizagem. Apesar da recuperação do manto cerebral, a tortuosidade e deformação dos dendritos corticais permanecem mesmo quando o tratamento precoce é estabelecido. (AOYAMA *et al.*, 2006).

Os axônios da substância branca periventricular apresentam o menor grau de recuperação após tratamento de pacientes com hidrocefalia. A permanência da lesão axonal pode explicar em parte a perda das habilidades cognitivas e motoras observadas nestes pacientes (AOYAMA *et al.*, 2006). Nos casos de hidrocefalia congênita e neonatal, em que o dano causado pela ventriculomegalia afeta processos de proliferação e maturação de células precursoras da oligodendróglia, é possível que não ocorra regeneração dos oligodendrócitos, resultando em prejuízo permanente do processo de mielinização (DEL BIGIO; ZHANG, 1998).

Como já mencionado anteriormente, a proliferação de astrócitos reativos, apesar de poder reduzir a complacência cerebral, tem como efeitos benéficos a absorção do edema intersticial, eliminação da bainha de mielina lesada e reparo da mesma em conjunto com a micróglia (AOYAMA *et al.*, 2006). Vale lembrar que todas as alterações patológicas mencionadas acima se

repetem ou até mesmo podem se agravar na ocorrência de mau funcionamento da derivação cirúrgica.

1.3 Hidrocefalia Experimental

1.3.1 Modelo de hidrocefalia em ratos

Nos últimos 50 anos diversos modelos *in vivo* de hidrocefalia congênita ou adquirida foram desenvolvidos (CARDOSO *et al.*, 2011; WINN; YOUMANS, 2016). Um dos métodos mais aceitos para indução da hidrocefalia experimental consiste na injeção do caulim na cisterna magna, tendo sido utilizado em diversos modelos animais. A injeção intracisternal do caulim causa oclusão mecânica e reação inflamatória local como resposta à deposição do agente, resultando em obstrução do fluxo liquórico nas vias de saída do quarto ventrículo e conseqüente aumento das dimensões ventriculares (LOPES *et al.*, 2009; WILLIAMS *et al.*, 2014; WINN; YOUMANS, 2016).

O uso do caulim em ratos para estudo da hidrocefalia experimental é um método bem estabelecido, de baixo custo, facilidade de realização e com alta taxa de indução de ventriculomegalia (LOPES *et al.*, 2009).

1.3.2 Tratamento da hidrocefalia por derivação ventrículo-subcutânea

A derivação ventriculoperitoneal é o método padrão para tratamento da hidrocefalia na infância, conforme mencionado anteriormente. Entretanto, em casos em que não há possibilidade de realização de *shunt* definitivo devido às características do líquido (por infecção ou sangramento, por exemplo) ou pelo quadro clínico do paciente não permitir o procedimento, a derivação ventrículo-subgaleal tem sido utilizada como método temporário para desvio do fluxo liquórico. A técnica, com algumas variações descritas, consiste simplificada no desvio do fluxo liquórico em direção a uma loja subgaleal criada durante o ato cirúrgico. O procedimento é mais fisiológico e menos invasivo em comparação a outras técnicas para drenagem temporária do líquido, além de apresentar relativa baixa morbidade (NAGY *et al.*, 2012; RAHMAN, 1995; SANTOS *et al.*, 2016).

Existem poucas descrições de técnicas de derivação em modelos animais de hidrocefalia experimental, apesar do crescente número de estudos sobre o tema. Em ratos, a técnica da derivação ventrículo-subgaleal foi modificada, sendo utilizada a derivação ventrículo-subcutâneo-dorsal (LOPES, 1998). Santos e colaboradores (2016) descreveram técnica adaptada de derivação

ventrículo-subcutânea em ratos jovens da linhagem Wistar, que consistia na realização da derivação entre os ventrículos laterais e espaço subcutâneo dorsal próximo à cauda do animal. A técnica mostrou ser boa representação experimental do tratamento da hidrocefalia (SANTOS *et al.*, 2016).

1.3.3 Ultrassonografia

A ultrassonografia tem como base o uso de ondas mecânicas que podem ser transmitidas através de diferentes tipos de materiais, como fluidos, tecidos moles ou sólidos. Os aparelhos de ultrassom utilizados na prática médica geram ondas sonográficas que são transmitidas através dos tecidos e posteriormente refletidas em direção ao transdutor, produzindo a imagem na tela do aparelho. A capacidade de transmissão e reflexão das ondas depende das características do material: em tecidos mais sólidos, as partículas são mais densas e as ondas sonográficas refletem mais; materiais fluidos, por sua vez, transmitem melhor as ondas em comparação com materiais sólidos (ABU-ZIDAN *et al.*, 2011). A ultrassonografia possui resolução temporal e espacial suficientes para que imagens precisas dos tecidos em questão sejam obtidas (SILVA *et al.*, 2021).

Há diversos relatos do uso de USG em hidrocefalia experimental, porém na sua maioria utilizando animais maiores, como cães e gatos. Além disso, a ultrassonografia foi usada primariamente para acompanhamento e classificação dos graus de ventriculomegalia (SILVA *et al.*, 2021).

O método ultrassonográfico apresenta dificuldades de visualização das cavidades ventriculares em animais utilizados como controle (sem hidrocefalia), conforme relatado por vários autores (BROWN *et al.*, 1984; WOLFSON *et al.*, 1989). Entretanto, estudo realizado por Silva *et al.* (2020) utilizando ratos jovens hidrocefálicos encontrou boa correlação entre a imagem do ultrassom e os achados anatômicos após a eutanásia (Figura 1). O acúmulo de LCR e expansão dos ventrículos laterais permitem uma boa visualização da anatomia cerebral, com imagens de alta definição, reforçando a importância do USG na avaliação da ventriculomegalia e de sua progressão, especialmente na hidrocefalia experimental (SILVA *et al.*, 2021).

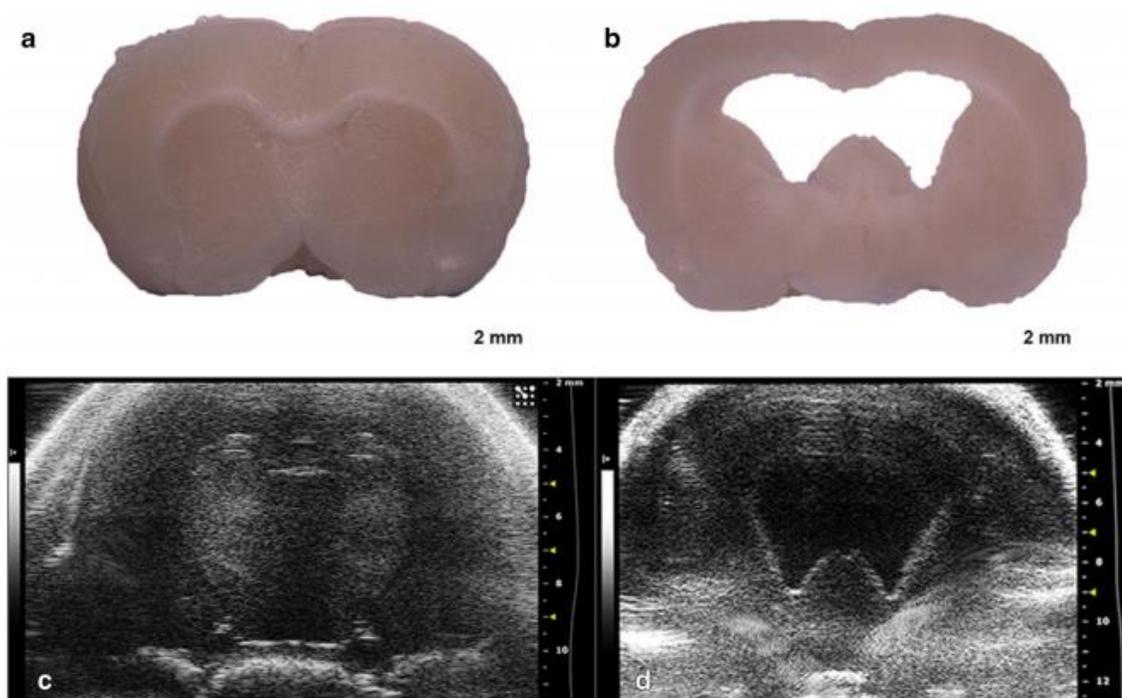


Figura 1 - Comparação entre espécimes anatômicos e imagens ultrassonográficas. Em a (peça anatômica) e c (ultrassonografia) são vistos cortes coronais de animal controle (rato sem hidrocefalia. Em b (peça anatômica) e d (ultrassonografia), corte coronal em modelo de rato com hidrocefalia induzida por Caulim. Modificado de: SILVA et al., 2016

2 Justificativa

A hidrocefalia experimental em modelos animais permitiu a compreensão de vários fatores envolvidos na fisiopatologia da hidrocefalia, e também das alterações anatômicas e funcionais que essa doença causa no encéfalo.

Através de análises histológicas e imunoistoquímicas, diversos estudos demonstraram as alterações que ocorrem na estrutura cerebral de pacientes hidrocefálicos, particularmente na substância branca periventricular e corpo caloso. Existem diversos modelos de tratamento da hidrocefalia em animais com uso da derivação ventricular, porém não há relatos na literatura de modelos que simulem a disfunção dos '*shunts*', bem como os efeitos estruturais e funcionais que essas disfunções possam acarretar. A prática clínica mostra que estes eventos de mau funcionamento das derivações são extremamente deletérios no curso do tratamento e acompanhamento de pacientes portadores de hidrocefalia.

Desse modo, este trabalho visa a contribuir para melhor compreensão dos efeitos causados pela recorrência da ventriculomegalia em pacientes previamente tratados.

3 Objetivos

3.1 Gerais

- > Induzir a hidrocefalia em ratos Wistar com 7 dias de vida, através do modelo experimental da injeção intracisternal de caulim;
- > Submeter estes animais a tratamento da hidrocefalia por meio de derivação ventrículo-subcutânea;
- > Após tratamento com derivação ventrículo-subcutânea, submeter estes animais a obstrução do sistema;
- > Tratar a disfunção do *shunt* neste grupo, retirando o fator de obstrução no terceiro dia a partir da data da obstrução;
- > Comparar os resultados obtidos nos animais submetidos à obstrução/desobstrução do *shunt* com os grupos controle, grupo hidrocefálico não tratado e grupo hidrocefálico tratado com DVSC.

3.2 Específicos

- > Estudar os efeitos da hidrocefalia experimental após realização do tratamento com derivação ventrículo-subcutânea e os efeitos da disfunção do *shunt* no comportamento do animal através da utilização dos testes do campo aberto e Labirinto Aquático de Morris ;
- > Avaliar a citoarquitetura periventricular através de estudo histológico com hematoxilina-eosina e a estrutura cortical, espessura do corpo caloso e o grau de mielinização da substância branca periventricular por meio da coloração com luxol;
- > Avaliação qualitativa e quantitativa da presença de astrócitos reativos e astrogliose através de imunistoquímica para GFAP (*glial fibrillary acidic protein* – proteína glial fibrilar ácida);
- > Avaliação de atividade inflamatória por estudo imunistoquímico para COX-2;
- > Avaliação da diferenciação neuronal por estudo imunistoquímico para NeuN;
- > Avaliação da atividade apoptótica por estudo imunistoquímico para Caspase.

4 Materiais e Métodos

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo experimental animal com modelo induzido controlado.

4.2 Amostragem e Grupos experimentais

Todos os procedimentos envolvendo os animais estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório / Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Todos os esforços foram feitos a fim de minimizar o sofrimento e a quantidade de animais usados nesta pesquisa.

Foram utilizadas ninhadas de ratos da linhagem Wistar Hannover, com sete dias de vida, oriundas do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto, em número suficiente para composição dos grupos experimentais.

Em média, cada ninhada foi constituída pela rata-mãe e 8 a 10 filhotes, que foram transportados em uma única caixa alojamento, no dia do nascimento, para o Biotério da Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Durante a permanência dos animais no Biotério, dieta padrão de laboratório para roedores e água foram oferecidas *ad libitum* às mães. Os filhotes em fase de desmame também tiveram acesso à dieta e à água.

- Grupo Controle - sem hidrocefalia (C): animais não submetidos à injeção do caulim, sacrificados com 28 dias de vida sem serem submetidos a nenhuma intervenção (n=6).
- Grupo Hidrocefálico Não Tratado (NT): animais submetidos à indução de hidrocefalia por injeção suboccipital de caulim aos 7 dias de vida e sacrificados com 28 dias de vida (n=5).
- Grupo Hidrocefálico Tratado (T): animais submetidos à indução da hidrocefalia por injeção suboccipital de caulim aos 7 dias de vida, tratados com o sistema de DVSC no sétimo dia de evolução da hidrocefalia, e sacrificados 14 dias após a instalação da DVSC (n=7).

- Grupo Hidrocefálico Tratado com *shunt* obstruído (TOT): animais submetidos à indução da hidrocefalia por injeção suboccipital de caulim aos 7 dias de vida e tratados com o sistema de DVSC no sétimo dia de evolução da hidrocefalia. Seis dias após a derivação, o sistema foi obstruído (conforme descrição abaixo) e desobstruído (Revisão do *shunt*) após 3 dias de oclusão, sendo sacrificados 4 dias após realização do procedimento de revisão (n=5).

Todos os animais injetados com caulim foram observados diariamente quanto a possíveis alterações clínicas, tais como: perda de peso e desidratação, alterações da marcha e da consciência, negligência com a higiene. Também foram observados após os procedimentos cirúrgicos realizados.

A sequência de etapas utilizada para a realização dos experimentos encontra-se representada no fluxograma abaixo (Figura 2):

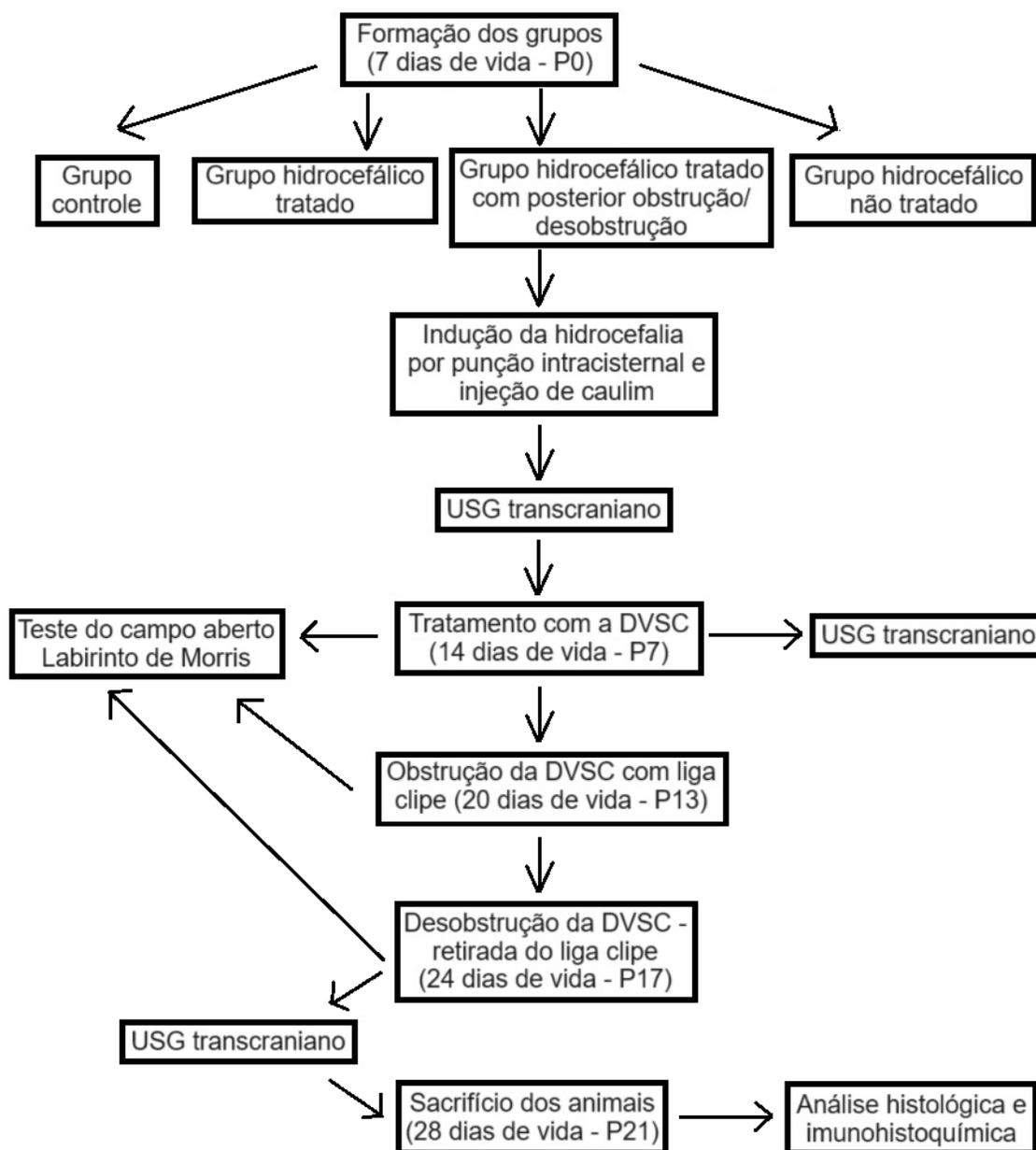


Figura 2 - Fluxograma das etapas do estudo

4.3 Indução da hidrocefalia

O método utilizado para indução da hidrocefalia deu-se pela injeção de caulim intracisternal conforme descrito por Lopes e colaboradores. (1998). Os filhotes foram escolhidos aleatoriamente e a injeção do caulim ocorreu no 7º dia após o nascimento.

Nesta técnica, cada rato é posicionado por um assistente, que imobiliza a cabeça e o corpo do animal utilizando ambas as mãos, uma para cada parte do corpo; o pescoço é fletido e a região cervical dorsal é deixada livre. O local da punção é identificado através da palpação, tendo como parâmetros anatômicos a margem posterior do forame magno no osso occipital e a borda cranial do arco posterior da primeira vértebra cervical; o espaço entre eles constitui o local da punção, na linha mediana.

Utilizou-se 0,04 ml de uma suspensão de caulim (Merck®) a 15% em água destilada, esterilizada a 60°C em autoclave. Procedeu-se à injeção lenta da suspensão através de punção suboccipital percutânea, utilizando uma agulha odontológica de bisel curto, Mise 0,3.

Após a punção, os animais foram recolocados em sua caixa alojamento de origem, retornando ao Biotério.

4.4 Implante da derivação liquórica ventrículo-subcutânea (DVSC)

A confirmação da ventriculomegalia e avaliação da sua gravidade foi realizada através de USG transcraniano, realizado imediatamente antes do procedimento cirúrgico. A tricotomia da cabeça foi realizada no preparo para o exame. Após a confirmação do surgimento da hidrocefalia, procedeu-se a técnica de derivação ventrículo-subcutânea descrita por Santos e colaboradores. (2016).

Os ratos foram anestesiados por via inalatória com Isoflurano (BioChimico®), e posicionados em decúbito ventral para início do procedimento.

Realizou-se inicialmente o preparo cirúrgico, que consistia na administração de antibioticoterapia profilática (Cefalotina 50mg/Kg, intraperitoneal), antissepsia da pele da cabeça e do dorso com solução de iodopolividona, e colocação de campos operatórios.

Após o devido preparo procedeu-se a incisão cirúrgica de aproximadamente 5 mm, perpendicular ao plano sagital mediano, realizada na cabeça 3 mm à direita da linha média e 2 mm anterior à sutura coronal (Figura 3), envolvendo todos os planos do tegumento, até atingir a superfície óssea.

O orifício no crânio, de aproximadamente 1 mm, foi realizado com auxílio de um perfurador elétrico rotativo de ponta delicada, até a exposição e posterior abertura da dura-máter. Utilizando cateter de polipropileno de 0,7 mm de diâmetro e 8 mm de extensão, foi realizada punção do ventrículo lateral direito com angulação de 90° em relação a superfície óssea. A extensão posterior

(cateter distal) de 8-10 cm de comprimento foi tunelizada pelo subcutâneo do pescoço e do dorso e sepultada próximo à raiz da cauda.

A sutura da incisão cutânea foi feita em plano único, com pontos simples contínuos, utilizando Prolene 5.0. Todos os instrumentos cirúrgicos utilizados para o procedimento foram esterilizados em autoclave e o sistema de derivação foi esterilizado em óxido de etileno. Após término do procedimento, os animais foram encaminhados para recuperação anestésica e posteriormente retornaram à caixa-alojamento de origem. Para confirmação do sucesso do procedimento foi realizado USG após 7 dias da cirurgia.

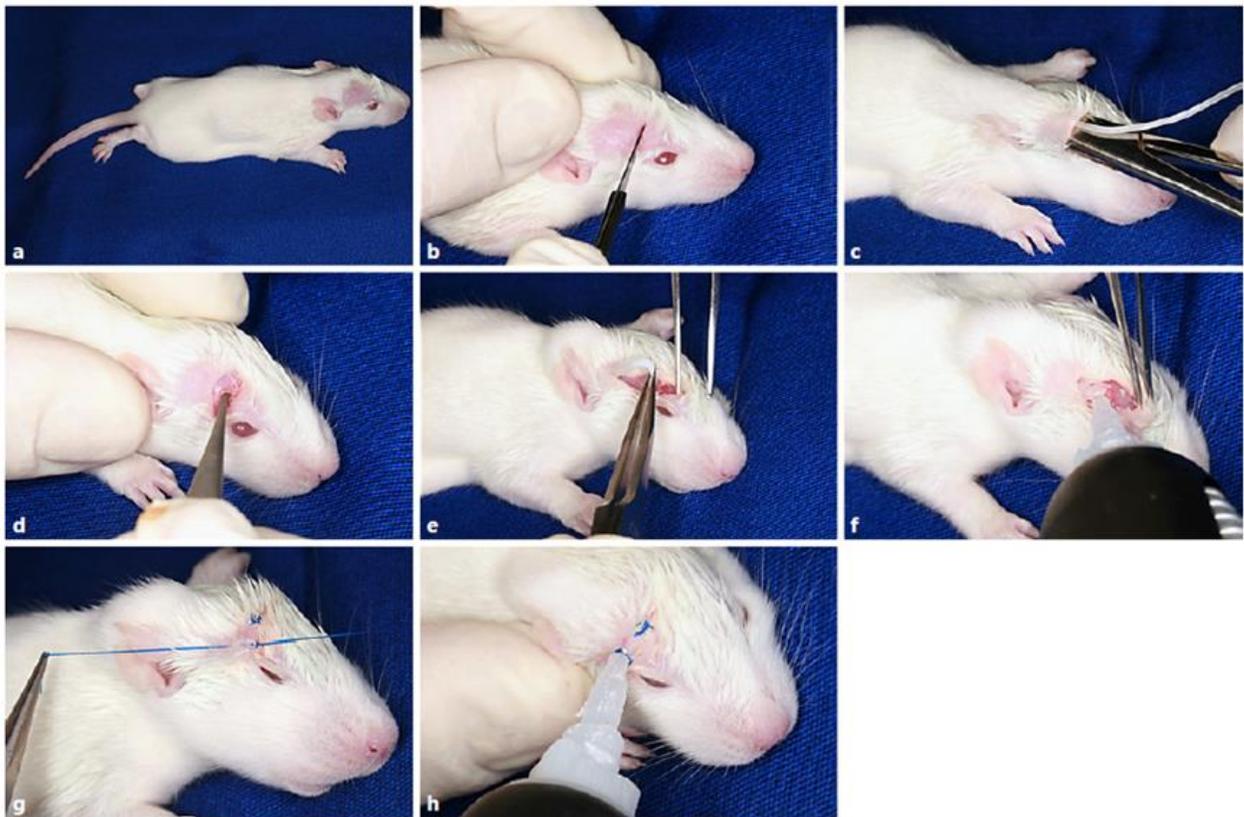


Figura 3 – Representação iconográfica sequencial da técnica de derivação ventrículo-subcutânea num rato Wistar de sete dias de vida. (A) Preparação e raspagem dos pelos da cabeça; (B) Incisão cutânea com pequeno bisturi número 15; (C) Tunelização do cateter distal; (D) Burr-hole com drill de 1mm de diâmetro; (E) Punção ventricular; (F) Uma gota de cola de cianoacrilato é colocada para selar a perfuração craniana e evitar migração do cateter; (G) Síntese da pele; (H) Outra gota de cola de cianoacrilato é colocada sobre a incisão cutânea. Fonte: SANTOS, 2016.

4.5 Oclusão e revisão do sistema de derivação ventrículo-subcutânea

Após realização do tratamento com a DVSC e confirmação da redução das dimensões ventriculares utilizando USG, procedeu-se à oclusão do *shunt* a partir do clampeamento do cateter distal no 13º dia (P13) após confirmação da hidrocefalia, que corresponde ao 6º dia após a realização do tratamento com a DVSC. A figura 4 mostra o cateter utilizado e a maneira como foi realizado seu clampeamento.

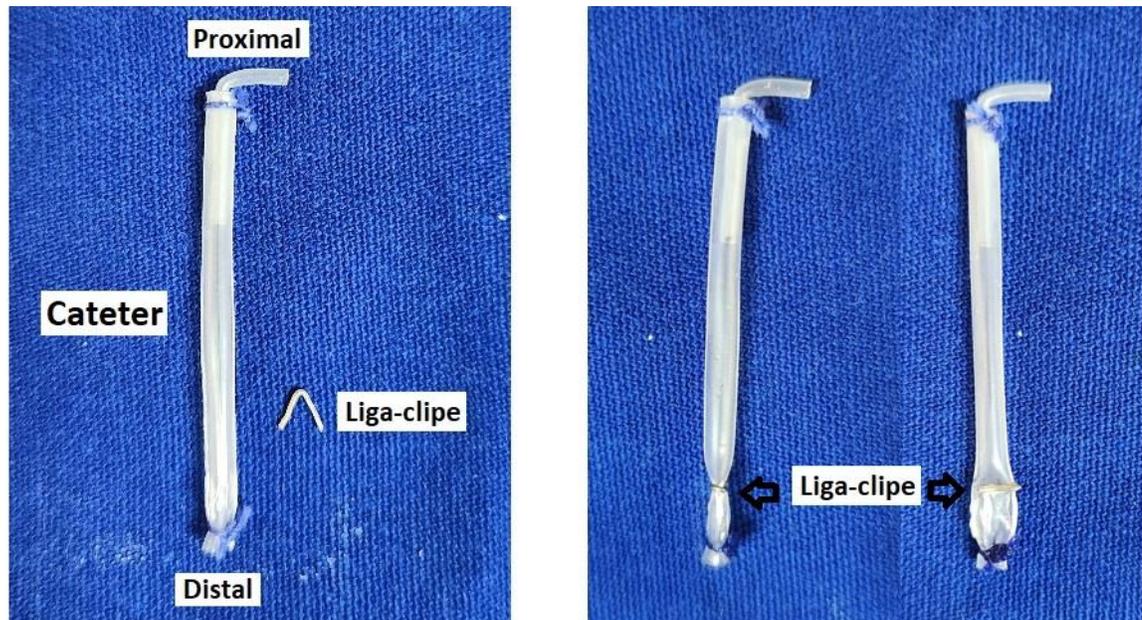


Figura 4 - Representação do cateter utilizado para derivação ventrículo-subcutânea e do liga-clipe utilizado para seu clampeamento. A imagem à direita mostra a oclusão do cateter distal.

Os ratos foram novamente anestesiados por via inalatória com Isoflurano, e posicionados em decúbito ventral para início do procedimento.

Realizou-se preparo cirúrgico, com administração de antibioticoterapia profilática (Cefalotina 50 mg/Kg, intraperitoneal), tricotomia e antisepsia da pele do dorso com solução de iodopolividona, e colocação de campos operatórios.

Após devido preparo, procedeu-se a realização de incisão na pele de aproximadamente 5 mm sobre a bolsa subcutânea previamente criada, até identificação da extremidade do cateter distal. Utilizando clipe de ligadura de titânio (Weck Horizon, *small*), foi realizado clampeamento do cateter. Após confirmação visual da interrupção do fluxo liquorico, foi feita sutura da incisão cirúrgica da pele utilizando Prolene 5-0. Terminado o procedimento, os animais foram encaminhados para recuperação anestésica e posteriormente retornaram à caixa-alojamento de

origem. Para confirmação da recorrência da hidrocefalia foi realizado estudo ultrassonográfico após 3 dias do procedimento.

Imediatamente após a realização do USG (3 dias após o último procedimento), nos animais do grupo hidrocefálico tratado com *shunt* obstruído, foi realizada nova abordagem para revisão do *shunt*, com retirada do clipe de ligadura ou secção do cateter distal imediatamente à montante do local onde o clipe de ligadura estará implantado. Foram repetidos os passos da indução anestésica e preparo cirúrgico até realização da incisão subcutânea e retirada do clipe ou secção do cateter, conforme descrito anteriormente. Após confirmação visual do retorno do fluxo liquórico, procedeu-se ao fechamento da incisão com Prolene 5-0.

4.6 Estudos comportamentais

Todos os animais foram pesados diariamente desde o P0 (7 dias de vida) até o P21 (28 dias de vida). Foi avaliada a progressão do ganho de peso em cada em grupo e realizada comparação da média de ganho de peso em cada grupo ao final do experimento (P21).

Foram alvo de estudo comportamental o desenvolvimento sensório-motor, o comportamento deambulatório e a capacidade de memória e aprendizagem espacial, sendo utilizado protocolo já estabelecido em estudo anterior realizado pelo grupo de pesquisa (SANTOS, 2016).

4.6.1 Teste do campo aberto (*Open Field*)

O teste do campo aberto foi utilizado para avaliação do desenvolvimento sensório-motor e do comportamento deambulatório (Figura 5). Todos os animais foram avaliados em dias previamente determinados. Para cada animal, foram realizadas ao todo 8 avaliações de campo aberto, em dias alternados, a partir do P6.

A comparação estatística entre o grupo HTOT e os demais grupos foi realizada em três períodos: em P6 (1 dia antes da DVSC nos grupos cirúrgicos), P16 (3 dias após a obstrução da DVSC) e P20 (3 dias após a desobstrução da DVSC).

A arena utilizada é feita de material acrílico transparente, com 60 cm de lado e 45 cm de altura. Os animais foram filmados por 5 min, cronometrados a partir do início do movimento na arena. Os filmes gravados foram analisados utilizando o software X-plo-rat 2005. Foram analisados

os tempos em que os animais permaneciam na borda ou centro da plataforma, bem como o tempo em que era realizada exploração vertical e auto-limpeza (*grooming*).

Foram avaliadas também a capacidade de exploração do ambiente e a marcha, de acordo com escala já utilizada: 4 = alerta, com exploração e marcha normais; 3 = discretamente letárgico, com atividade reduzida, mas com marcha normal quando estimulado; 2 = cifótico, caminha, mas a marcha tem base alargada, instável ou atáxica; 1 = mal consegue andar, mas ainda se alimenta; 0 = próximo da morte ou eutanasiado. Para maior confiabilidade dos dados, o *escore* atribuído a cada animal deu-se pela mediana entre os *escores* encontrados por três examinadores diferentes. Cada animal foi avaliado individualmente, sendo a arena limpa com álcool a 70% após observação de cada animal.



Figura 5 - Animal durante avaliação no teste de campo aberto. O círculo desenhado na plataforma foi considerado como parâmetro para análise dos vídeos em relação ao tempo de permanência na “borda” ou “centro”.

4.6.2 Teste do labirinto aquático de Morris (*Water Maze*)

O teste com labirinto aquático de Morris modificado foi utilizado para o estudo da memória e aprendizagem espacial. O aparelho é composto por uma piscina circular de 100 cm de diâmetro e 50 cm de altura e uma plataforma transparente (34 cm de altura, 8 cm de diâmetro), posicionada 2 cm abaixo da superfície da água, no quadrante entre as posições Norte e Oeste (Figura 6). A piscina é preenchida por água, mantida em temperatura de aproximadamente 22°C.

O tanque é dividido aleatoriamente em 4 quadrantes; pontos cardeais são definidos nos quadrantes da piscina. A sala que contém o tanque é totalmente escura, com exceção de um

pequeno foco luminoso fixado em um dos pontos externos do tanque (norte), para ser utilizado como ponto de referência para o animal.

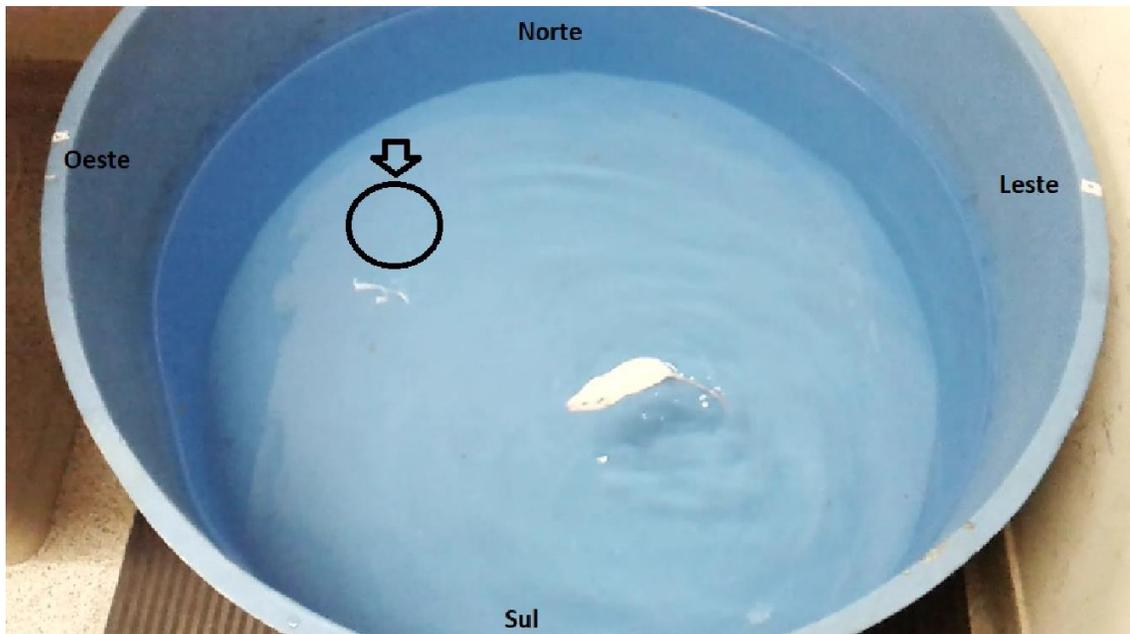


Figura 6: Animal durante treino do teste do labirinto aquático: a seta e o círculo representam o local onde será posicionada a plataforma. Estão representados os referenciais utilizados durante a realização do teste (Norte, Sul, Leste e Oeste).

No 14º dia pós-indução da hidrocefalia (P14) foi realizada a fase de adaptação e treinamento. Inicialmente (fase de adaptação), os ratos tiveram 60 segundos livres para nadar na piscina, sem a plataforma. A seguir, a plataforma foi introduzida no tanque, posicionada em um dos quadrantes anteriormente definidos. A fase do treinamento foi realizada em quatro séries: em cada uma delas o animal foi colocado na água voltado para um dos 4 pontos cardeais. A intenção era permitir que o rato localizasse a plataforma submersa camuflada utilizando a parede iluminada como ponto de referência, e não o encontro ao acaso da plataforma. Foram realizados dois turnos diários por animal.

Foi utilizado o tempo limite de 60 segundos para o animal alcançar a plataforma e ser considerado um acerto. No final de cada sessão, o animal era colocado na plataforma para descanso de 15 segundos, sendo então recolocado junto à parede da piscina para iniciar uma nova sessão. O tempo gasto desde o ponto de partida até o encontro da plataforma foi cronometrado e calculado o tempo médio de cada turno diário (dado pela média do tempo gasto para o encontro da plataforma

em cada uma das 4 sessões). Caso o animal não encontrasse a plataforma dentro do tempo limite estabelecido (60 segundos), o tempo considerado na execução foi de 60 segundos.

Ao final do teste, o animal foi seco com uma toalha macia e mantido em uma caixa aquecida, e posteriormente recolocado junto a mãe e os outros filhotes da ninhada. Entre cada animal examinado, foi realizada limpeza da água da arena utilizando peneira para retirar dejetos animais sólidos e partículas da cama de maravalha que estivessem visíveis.

O teste foi aplicado novamente no 15º e 16º dias pós indução da hidrocefalia (P15 e P16), respectivamente), em dois períodos (manhã e tarde). O procedimento foi semelhante ao realizado na fase de treinamento anteriormente descrito, em ambos os períodos.

Excepcionalmente, os animais do Grupo Hidrocefálico com *Shunt* Obstruído, posteriormente tratado – HTOT, após confirmação ultrassonográfica da melhora da hidrocefalia após o último procedimento, foram submetidos novamente ao teste do labirinto aquático nos P19 e P20. O objetivo é avaliar a memória e a aprendizagem espacial nos animais após período de descompensação da hidrocefalia. O teste ocorreu de maneira semelhante ao descrito na fase de treinamento, também em dois períodos distintos (manhã e tarde).

4.7 Estudo ultrassonográfico

Após a indução da hidrocefalia e para análise das dimensões ventriculares antes e após os procedimentos realizados (instalação, obstrução e revisão do shunt), os animais foram encaminhados para realização de ultrassonografia. A aquisição das imagens ocorreu sob anestesia inalatória utilizando Isoflurano a 2% e oxigênio nasal a 0,8L/min em caixa de indução e cone nasal; o aparelho de USG utilizado foi o VEVO 2100 (VisualSonics, Washington, EUA).

Foi utilizada a técnica descrita por Silva *et al.* (2021) em estudo realizado pelo grupo de pesquisa, que consiste no posicionamento de um transdutor linear de 30MHz no vértex, com aquisição de uma série de cortes dos ventrículos cerebrais no plano coronal (Figura 7). A medição da largura dos ventrículos laterais e do cérebro é realizada no primeiro corte visto após visualização do limite anterior do terceiro ventrículo juntamente com o forame interventricular (Figura 8). Após a captura das imagens, os animais foram posicionados em plataforma aquecida até recuperação anestésica e posteriormente recolocados na caixa junto à mãe ou encaminhados diretamente para procedimento cirúrgico, a depender do grupo a ser estudado.

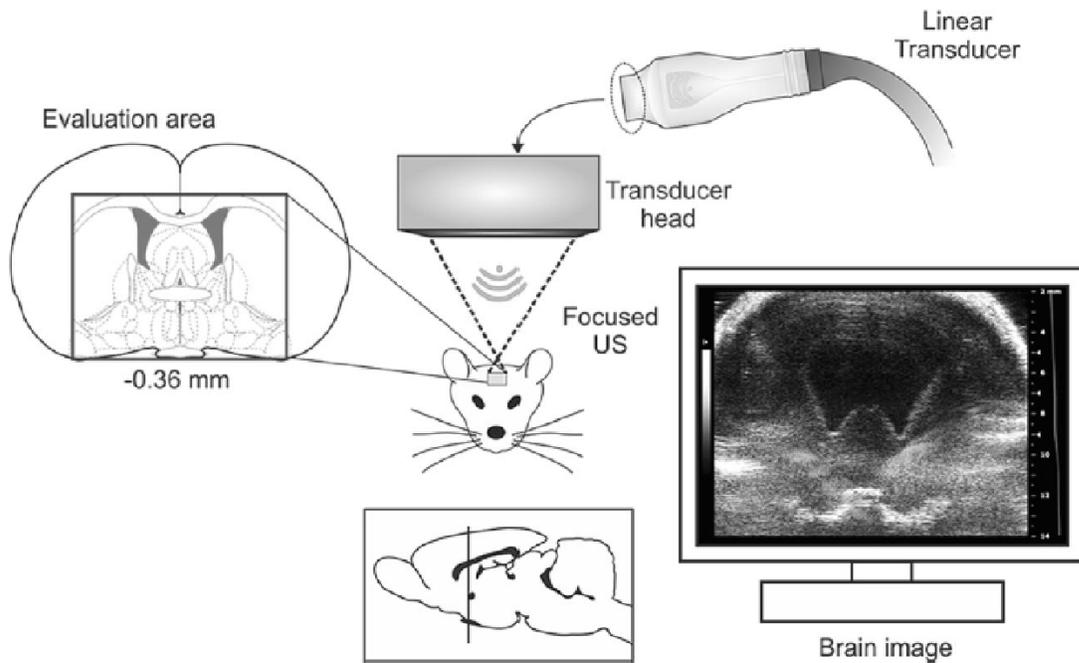


Figura 7: Representação da realização da Ultrassonografia em ratos. Adaptado de LOPES et. al., 2021.

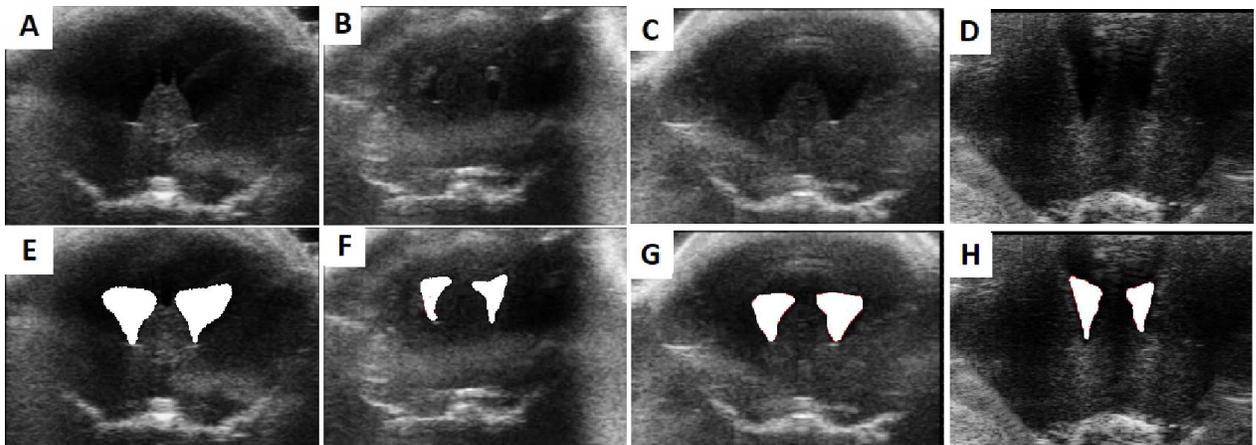


Figura 8: Série ultrassonográfica de animal do grupo HTOT. A-E: imediatamente antes da realização da DVSC; B-F: imediatamente antes da obstrução da DVSC; C-G: imediatamente antes da desobstrução da DVSC; D-H: imediatamente antes da eutanásia. Nota-se acentuada diminuição da dilatação após o tratamento ventricular após a realização da DVSC. Após sua obstrução pode-se observar novo aumento das dimensões ventriculares, com nova redução após desobstrução do sistema.

4.8 Técnica de coleta e preparação do tecido cerebral

Ao final dos tempos experimentais, os animais foram sacrificados, utilizando técnica previamente estabelecida. Inicia-se o procedimento com anestesia inalatória profunda com Isoflurano. Os animais são posicionados em mesa cirúrgica, em decúbito dorsal. Procedeu-se a realização de duas incisões cirúrgicas amplas, uma torácica anterior em “Y”, com extensão das clavículas até o apêndice xifoide e outra abdominal mediana, xifo-púbica. Realizava-se a punção da ponta do ventrículo cardíaco esquerdo com agulha BD 20G (Becton Dickinson, New Jersey, US), introduzindo-a até a raiz da aorta.

Após a punção ventricular, realizava-se uma pequena incisão na aurícula direita, iniciando-se então a perfusão cardíaca com solução salina tamponada. Utilizando uma bomba de perfusão peristáltica (*Fisher Scientific*®), era realizada a limpeza do leito vascular até a saída de líquido claro pela abertura na aurícula (cerca de 1 ml/g de peso do animal).

A próxima etapa consistia na remoção do encéfalo através de uma craniectomia de vértex. Após sua retirada, os encéfalos foram divididos na linha mediana.

As metades esquerdas foram acondicionadas em tubo eppendorf devidamente identificados, procedendo-se então ao congelamento imediato em nitrogênio líquido e manutenção em freezer com temperatura de -80°C para análises em projetos futuros. As metades direitas dos encéfalos foram subdivididas em duas porções, tomando como referencial o quiasma óptico: uma anterior (frontal) e outra posterior (parietal), sendo ambas imersas em uma solução fixadora de paraformaldeído 3% em tampão fosfato (PBS) 0,1M (pH 7,3 – 7,4), por 24 horas, à temperatura de 4°C. Posteriormente, as porções foram transferidas para solução de paraformaldeído 3% fresca e assim mantidas por mais 7 dias, sob refrigeração.

Passado o período de 7 dias, as porções das metades direitas foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (50% a 100%), diafanizadas em xilol, embebidas e emblocadas em parafina.

4.9 Histologia e imunoistoquímica

Para análises histológicas, os blocos de parafina foram cortados em cortes paralelos ao plano coronal em micrótomo rotativo em secções de 5µm de espessura, para análise por HE e imunoistoquímica, e 8 µm para análise por LFB. A seguir, os cortes foram estendidos em lâminas histológicas para microscopia (Knittel, Lowestoft, Reino Unido). As lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por uma hora para derretimento da parafina. A seguir, os cortes foram desparafinizados e reidratados em banhos sequenciais de xilol, álcool em concentrações

decrecentes e água. Posteriormente, as mesmas lâminas de um mesmo espécime foram submetidas aos protocolos de HE, LFB, marcação por Fluoro Jade-B e imunistoquímicas.

Na coloração feita por HE, analisamos a citoarquitetura geral, por observação da distribuição das estruturas e a densidade celular. Foram analisadas duas regiões cerebrais: corpo caloso e matriz germinativa. Os núcleos corados pela hematoxilina ficam evidenciados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, visualizados em rosa. Já com o LFB, avalia-se o grau de mielinização da substância branca periventricular, e é realizada a medida da espessura do corpo caloso. A mielinização é quantificada através de confronto visual e aplicação de um escore de intensidade da cor azul, em que uma tonalidade mais escura é vista em regiões com maior densidade de mielina, e tonalidades mais claras em regiões com menor densidade de mielina. O escore é aplicado de acordo com as notas: 0= tonalidade fraca; 1= tonalidade média; e 2= tonalidade forte.

Para os estudos imunistoquímicos, as lâminas são mantidas em estufa a 60°C por 30 minutos e desparafinizadas em banhos sequenciais de xilol e álcool. As proteínas a serem estudadas são: GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) para avaliação da distribuição e aspecto morfológico da astróglia; COX-2 para avaliação da atividade inflamatória; caspase-3 para avaliação da atividade apoptótica; e neuN para avaliação da diferenciação neuronal. Para maior confiabilidade dos dados, três pesquisadores diferentes realizaram a avaliação das lâminas, sendo considerada para análise a média da contagem de cada lâmina, tanto com relação ao número de astrócitos quanto ao escore de intensidade de gradação.

Os protocolos utilizados nas análises imunistoquímicas incluem o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em PBS. Posteriormente, é feito o bloqueio com soro adequado a 10% em PBS por 30 minutos, em câmara úmida. Em seguida, os cortes são incubados de um dia para o outro à temperatura de 4°C com o anticorpo primário anti-GFAPZ0334 (DAKO, Santa Clara, EUA). Para os anticorpos anti-COX2 Ab15191, anti-NeuN e anti-Caspase-3, antes do bloqueio com a peroxidase endógena, é realizada a recuperação antigênica com citrato de sódio aquecido. Após lavar o anticorpo primário, é adicionado o anticorpo secundário apropriado (biotinilado de cabra anti-coelho SC-2040 ou anti-mouseSC-2039 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA) diluído 1:300 em BSA. Após, são incubados com o conjugado estreptavidina - HRP 405210 (BioLegend, Califórnia, EUA) diluído 1:400 em PBS. A seguir, são revelados com DAB (3,3-diaminobenzidina D8001, Merck Millipore, Massachusetts, EUA). Por fim, as lâminas serão

submetidas à contra coloração com hematoxilina, lavadas em água corrente, desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de álcool e xilol, e recobertas por lamínulas montadas com *Permount* (Fisher Scientific, Hampton, EUA).

Através do estudo imunistoquímico por GFAP realizou-se análise quantitativa e qualitativa da reação astrocitária por meio da contagem de astrócitos reativos em uma área de 1mm² (densidade celular) e da graduação da intensidade da marcação (escore), respectivamente. A pesquisa dos astrócitos reativos foi feita em quatro regiões: corpo caloso (CC), matriz germinativa (MG), córtex cerebral dorsal ao corpo caloso (CTx_CC) e hipocampo (CA1, CA2, CA3 e GD). A contagem celular para determinação do número de astrócitos foi realizada com auxílio do Software Image J. O grau de marcação pelo GFAP foi determinado de acordo com as características dos prolongamentos astrocitários e da intensidade da cor nas células marcadas: 1 – prolongamentos pouco ou nada visíveis; 2 – prolongamentos mais espessos e visíveis; 3 – prolongamentos grosseiros e irregulares.

A análise da Caspase-3, uma proteína citoplasmática, foi utilizada para avaliar a apoptose no tecido cerebral. Foi feita uma varredura em toda a extensão do córtex dorsal ao corpo caloso (CTx_CC) e do córtex dorsal ao hipocampo (CTx_H), contando todas as células marcadas nessas regiões.

A imunistoquímica para a ciclooxigenase-2 (COX-2), uma proteína de membrana, foi realizada para avaliar a neuroinflamação. Foram analisadas as regiões do CTx_CC, CTx_H, CC e MG e as subáreas hipocámpais (CA1, CA2, CA3 e GD) contabilizadas as células imunomarcadas e feito o cálculo de densidade de marcação (células positivas/total de células x100).

Para determinar se a hidrocefalia e seus respectivos tratamentos estudados alteram/preservam o número total e a densidade de neurônios, realizamos a análise imunistoquímica para NeuN (*neuronal nuclei*) de localização nuclear e citoplasmática. Foram analisadas as regiões do CTx_CC, as subáreas hipocámpais (CA1, CA2, CA3 e GD) e o CTx_H. Foram feitos o cálculo da densidade celular (nº total de neurônios/área) e o cálculo da porcentagem de marcação (células positivas/total de células x100) para observar a imunorreatividade de NeuN após o insulto neural.

Para documentação fotográfica das lâminas histológicas e contagem de células foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse E200MV com sistema de captura digital de imagens (MOTICAN 10) com software dedicado em ambiente Windows Motic Image 2.0, instalado no Laboratório de

Proteção Cerebral na Infância. Para as ilustrações da monografia e publicação foi utilizado um microscópio de luz AxiosKop2 plus (Carl Zeiss) e uma câmera digital AxioCam HRC (Carl Zeiss) acoplados à um computador Pentium II equipado com o software Axio Vision 3.1 instalado no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental, do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

5 Análise estatística

Os dados foram apresentados como médias (ou mediana) e desvio padrão. Para teste de normalidade foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para dados paramétricos foi usada a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, quando indicado. Para dados não-paramétricos, o teste usado foi o Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Para a avaliação dos tempos no teste do *Open Field* foi utilizado modelo linear de efeitos mistos. As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$. Foram utilizados os programas GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software In., San Diego, Califórnia, EUA) e SAS 9.4.

6 Resultados

6.1 Peso

Os animais tiveram uma média de peso inicial muito semelhante ao início do procedimento, não havendo diferença de peso significativa entre os grupos ($p=0,28$). Pelo gráfico observa-se que o grupo HTOT teve a menor taxa de ganho de peso em comparação com os demais grupos (Figura 9). As médias dos pesos iniciais, finais e do ganho de peso de cada grupo estão descritos na tabela 1.

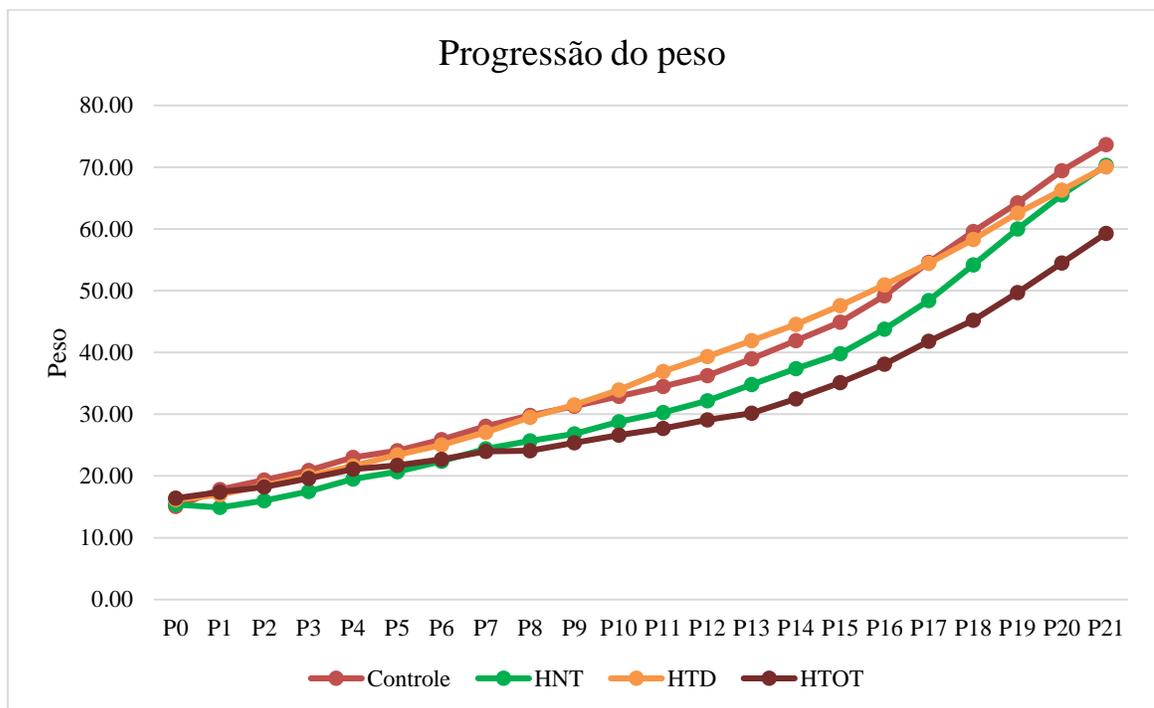


Figura 9 – Gráfico: Média do ganho de peso de cada grupo estudado. Controle – animais sem hidrocefalia; HNT – animais com hidrocefalia não tratada; HTD – animais hidrocefálicos tratados com derivação ventrículo-subcutânea (DVSC); HTOT – animais hidrocefálicos tratados que tiveram o sistema ocluído e posteriormente desobstruído. O grupo HTOT teve a menor taxa de ganho de peso entre todos os grupos.

Tabela 1 - Média do ganho de peso entre os diferentes grupos. Pode-se observar que o grupo HTOT apresenta ganho de peso inferior aos demais grupos

Média dos pesos inicial e final e do ganho de peso ao final do experimento						
	Peso no P0		Peso no P21		P21-P0	
Grupos	Peso	DP	Peso	DP	Ganho de Peso	DP
Control	15,08	1,72	73,67	6,94	57,78	6,11
HNT	15,4	0,37	70,30	8,12	54,41	8,09
HTD	16,14	1,36	70,07	5,89	54,62	4,91
HTOT	16,40	2,52	59,30	9,18	43,41	7,45

Tabela 2 – Média da diferença de ganho de peso entre os diferentes grupos.

Ganho P21-P0 – comparação entre grupos		
Grupos	Diferença na média	p-valor
C-HNT	3,36	n/s
C-HTD	3,16	n/s
C-HTOT	14,36	<0,01
HNT-HTD	0,20	n/s
HNT-HTOT	11,00	<0,05
HTD-HTOT	11,20	<0,05

A comparação entre os grupos mostrou que o grupo HTOT teve menor ganho de peso com relação a todos os demais grupos (Tabela 2).

6.2 Avaliação comportamental

6.2.1 Teste de campo aberto (*Open Field*)

6.2.1.1 Tempo nas bordas

A análise comparativa entre os grupos mostra que o tempo de permanência nas bordas do grupo HTOT foi maior que a do grupo controle e HT nos três períodos considerados, apresentando diferença significativa em relação a estes dois grupos em P20 e P16, respectivamente ($p < 0,05$). Com relação aos demais grupos, o grupo HT permaneceu menos tempo nas bordas em comparação ao grupo controle e ao grupo HNT no P16 ($p < 0,05$), sendo que essa tendência se inverteu no P20, período em que o grupo HT permaneceu mais tempo nas bordas que o grupo Controle (Figura 10, Tabela 3).

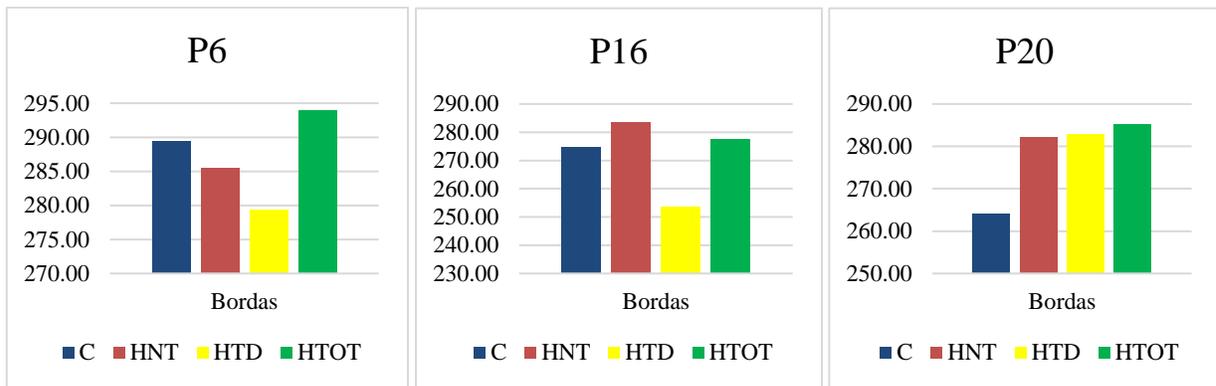


Figura 10 - Gráfico: Médias de tempo de permanência nas bordas dos diferentes grupos, em P6, P16 e P20. O grupo HTOT permaneceu mais tempo nas bordas em comparação aos grupos controle e HT em P20 e P16, respectivamente.

Tabela 3 - Comparação estatística das médias de tempo de permanência na borda entre os diferentes grupos, nos três períodos considerados (P6, P16 e P20).

Comparações	Diferença de Média	p-valor	IC 95%	
			LI	LS
(C-HNT) P6	4,05	0,68	-15,62	23,73
(C-HT) P6	10,12	0,27	-7,95	28,21
(HNT-HT) P6	6,07	0,52	-12,95	25,10
(C-HTOT) P6	-4,42	0,66	-24,10	15,26
(HNT-HTOT) P6	-8,47	0,42	-29,03	12,08
(HT-HTOT) P6	-14,55	0,13	-33,58	4,48
(C-HNT) P16	-8,77	0,38	-28,45	10,91
(C-HT) P16	21,04	0,02	2,96	39,12
(HNT-HT) P16	29,81	<0,01	10,78	48,84
(C-HTOT) P16	-2,60	0,79	-22,28	17,03
(HNT-HTOT) P16	6,17	0,55	-14,38	26,72
(HT-HTOT) P16	-23,64	0,01	-42,67	-4,61
(C-HNT) P20	-18,17	0,07	-37,85	1,50
(C-HT) P20	-18,92	0,04	-37,00	-0,84
(HNT-HT) P20	-0,75	0,94	-19,78	18,28
(C-HTOT) P20	-21,19	0,03	-40,86	-1,51
(HNT-HTOT) P20	-3,01	0,77	-23,56	17,54
(HT-HTOT) P20	-2,26	0,81	-21,29	16,77

6.2.1.2 Tempo no centro

Ao analisar o tempo de permanência dos animais no centro da arena, os resultados obtidos foram inversos aos atingidos na análise do tempo de permanência nas bordas (Figura 11, Tabela

4). Este desfecho era esperado ao se considerar que a permanência nas bordas e no centro são eventos mutuamente exclusivos.

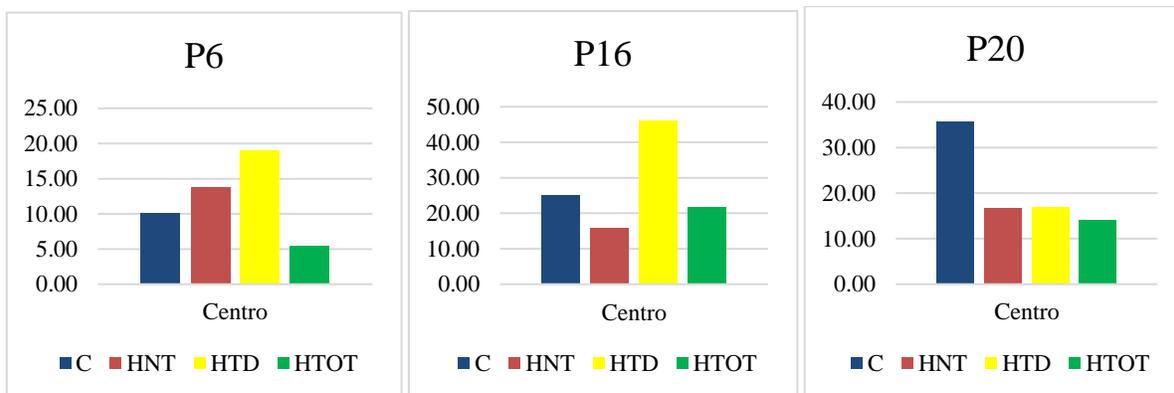


Figura 11 - Gráfico : Médias de tempo de permanência no centro dos diferentes grupos, em P6, P16 e P20.

Resultados são inversos aos encontrados na análise de permanência nas bordas. Pode-se notar maior tendência de permanência no centro pelos animais do grupo controle.

Tabela 4 - Comparação estatística das médias de tempo de permanência no centro entre os diferentes grupos, nos três períodos considerados (P6,P16 e P20).

Comparações	Diferença de Média	p-valor	IC 95%	
			LI	LS
(C-HNT) P6	-3,65	0,71	-23,37	16,05
(C-HT) P6	-9,01	0,33	-27,12	9,10
(HNT-HT) P6	-5,35	0,58	-24,41	13,71
(C-HTOT) P6	-17,29	0,08	-37,00	2,42
(HNT-HTOT) P6	8,28	0,43	-12,31	28,87
(HT-HTOT) P6	13,64	0,16	-5,42	32,70
(C-HNT) P16	9,34	0,35	-10,38	29,05
(C-HT) P16	-21,03	0,02	-39,14	-2,92
(HNT-HT) P16	-30,37	<0,01	-49,43	-11,31
(C-HTOT) P16	9,33	0,35	-10,38	29,05
(HNT-HTOT) P16	-5,87	0,57	-26,46	14,72
(HT-HTOT) P16	24,50	0,01	5,44	43,56
(C-HNT) P20	19,11	0,06	-0,60	38,82
(C-HT) P20	18,74	0,04	0,63	36,85
(HNT-HT) P20	-0,36	0,97	-19,42	18,70
(C-HTOT) P20	21,72	0,03	2,01	41,44
(HNT-HTOT) P20	2,62	0,80	-17,97	23,21
(HT-HTOT) P20	2,98	0,76	-16,08	22,04

6.2.1.3 Exploração vertical

Durante o teste do *Open Field*, foram considerados como “exploração vertical” os momentos em que os animais se sustentavam pelas duas patas traseiras, com ou sem o apoio lateral da arena. Pode-se observar que no 6º dia após a indução da hidrocefalia (P6) não houve diferença significativa no tempo de exploração vertical dentre os grupos. A partir do P16, o grupo HTOT teve menor tempo de exploração vertical que todos os demais grupos (C, HNT e HT) (Figura 12), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Tabela 5).

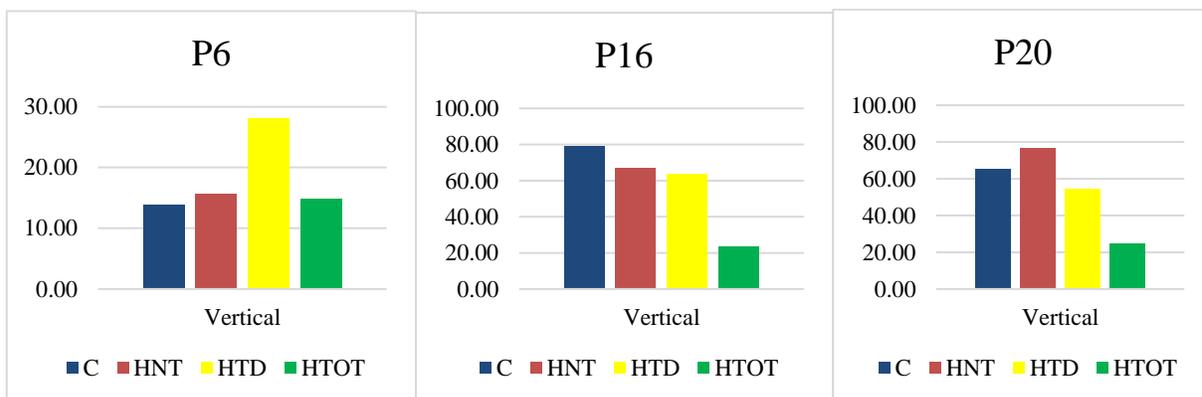


Figura 12 - Gráfico: Médias de tempo de exploração vertical, em P6, P16 e P20. O grupo HTOT teve o menor tempo de exploração vertical a partir de P16.

Tabela 5 – Comparação estatística das médias de tempo de exploração vertical entre os diferentes grupos, nos três períodos considerados (P6,P16 e P20).

Comparações	Diferença de Média	p-valor	IC 95%	
			LI	LS
(C-HNT) P6	-1,83	0,89	-28,84	25,18
(C-HT) P6	-14,30	0,26	-39,12	10,51
(HNT-HT) P6	-12,48	0,35	-38,59	13,64
(C-HTOT) P6	-0,91	0,95	-27,92	26,09
(HNT-HTOT) P6	0,91	0,95	-27,29	29,12
(HT-HTOT) P6	13,39	0,31	-12,72	39,51
(C-HNT) P16	12,16	0,37	-14,85	39,17
(C-HT) P16	14,90	0,24	-9,91	39,78
(HNT-HT) P16	2,74	0,83	-23,38	28,86
(C-HTOT) P16	55,44	<0,01	28,43	82,45
(HNT-HTOT) P16	43,28	<0,01	15,07	71,49
(HT-HTOT) P16	40,54	<0,01	14,42	66,65
(C-HNT) P20	-11,69	0,39	-38,69	15,32
(C-HT) P20	10,38	0,41	-14,43	35,19
(HNT-HT) 20	22,07	0,09	-4,04	48,19
(C-HTOT) P20	40,19	<0,01	13,18	67,20
(HNT-HTOT) P20	51,88	<0,01	23,67	80,09
(HT-HTOT) P20	29,81	0,02	3,69	55,93

6.2.1.4 Grooming

O termo *grooming* corresponde à realização da auto-limpeza pelos animais durante o tempo de permanência na arena. Os resultados obtidos demonstram que houve diferença no tempo de *grooming* entre o grupo controle e os grupos HNT e HT apenas no P20 (Figura 13, Tabela 6). Nos demais períodos considerados não houve diferença entre os grupos.

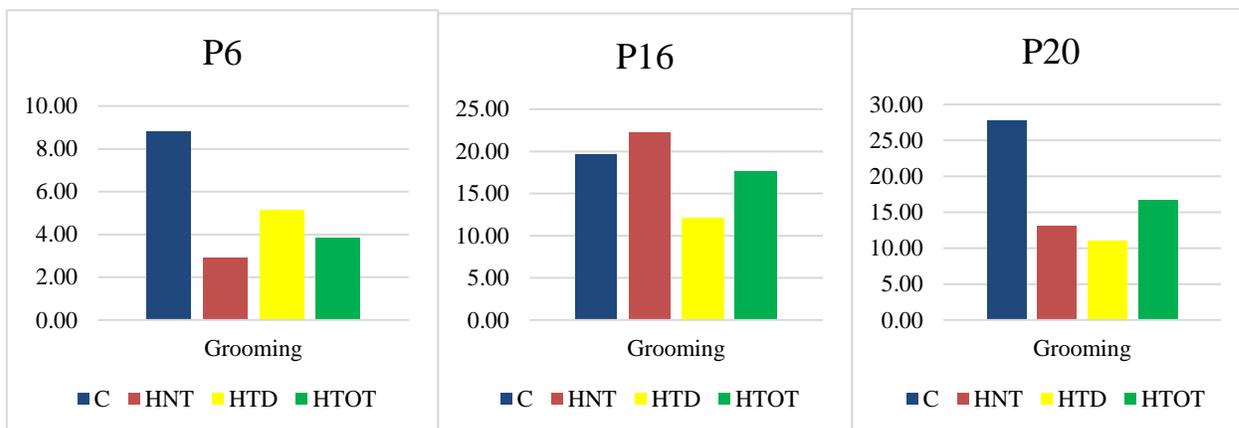


Figura 13 - Gráfico: Médias de tempo em grooming, em P6, P16 e P20. O grupo controle permanece mais tempo em *grooming* em comparação aos demais grupos, sendo significativa essa diferença apenas em P20 quando em comparação aos grupos HNT e HTD.

Tabela 6 - Comparação estatística das médias de tempo em grooming entre os diferentes grupos, nos três períodos considerados (P6, P16 e P20).

Comparações	Diferença de Média	p-valor	IC 95%	
			LI	LS
(C-HNT) P6	59,20	0,37	-72,08	190,49
(C-HT) P6	37,04	0,54	-83,58	157,67
(HNT-HT) P6	-22,16	0,73	-149,12	104,79
(C-HTOT) P6	49,82	0,45	-81,46	181,12
(HNT-HTOT) P6	-0,94	0,89	-146,51	127,7
(HT-HTOT) P6	12,78	0,84	-114,17	139,74
(C-HNT) P16	-25,68	0,70	-156,97	105,60
(C-HT) P16	76,14	0,21	-44,48	196,77
(HNT-HT) P16	101,83	0,11	-25,12	228,78
(C-HTOT) P16	19,87	0,76	-111,42	151,16
(HNT-HTOT) P16	45,55	0,51	-91,58	182,68
(HT-HTOT) P16	-56,28	0,38	-183,24	70,67
(C-HNT) P20	146,75	0,03	15,46	278,04
(C-HT) P20	167,09	<0,01	46,47	287,72
(HNT-HT) P20	20,34	0,75	-106,61	147,30
(C-HTOT) P20	111,06	0,09	-20,22	242,36
(HNT-HTOT) P20	-35,68	0,60	-172,81	101,44
(HT-HTOT) P20	-56,03	0,38	-182,98	70,93

6.2.1.5 Avaliação da marcha e do comportamento

A avaliação da marcha e do comportamento mostrou que todos os animais, com exceção daqueles pertencentes ao grupo hidrocefálico não tratado, atingiram características de marcha e comportamento normal (nota 4) em algum momento do experimento (Tabela 7). Os animais do grupo controle foram os que atingiram mais rapidamente a nota 4 (em P16), seguidos pelo grupo HTD (P18) e HTOT (P20) (Figura 14).

Tabela 7 - Mediana do Escore de cada grupo, em cada período avaliado.

	P6	P8	P10	P12	P14	P16	P18	P20
CONTROLE	2	2	2	3	3	4	4	4
HNT	2	2	2	3	3	3	3	3
HTD	2	2	2	3	3	3	4	4
HTOT	2	2	2	3	3	3	3	4

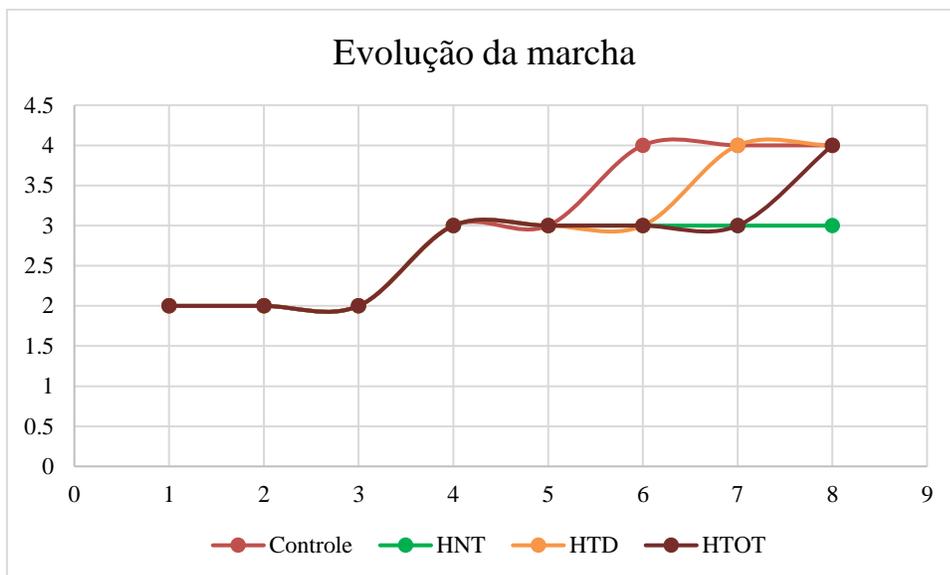


Figura 14 – Gráfico: Progressão da marcha de cada grupo, ao longo dos períodos considerados (1 corresponde a P6 – 8 corresponde a P20)

6.2.2 Labirinto aquático de Morris (*Watermaze*)

Os tempos médios obtidos por cada grupo animal em cada período estão sumarizados na tabela 8 (Figura 15).

Tabela 8 – Média do intervalo de tempo necessário para atingir a plataforma entre os diferentes grupos e na segunda avaliação do grupo HTOT. M1 – período matutino do primeiro dia; T1 – período vespertino do primeiro dia; M2 – período matutino do segundo dia; e T2 – período vespertino do segundo dia.

Grupo	Período	Média(s)	Desvio padrão
Controle	M1	14,13	7,36
	T1	17,08	11,78
	M2	9,63	1,60
	T2	6,13	1,38
HNT	M1	22,75	11,10
	T1	22,00	10,19
	M2	10,80	3,62
	T2	13,35	7,40
HT	M1	19,00	9,80
	T1	18,57	5,72
	M2	19,79	11,82
	T2	15,32	4,64
HTOT 1ª avaliação	M1	48,05	12,36
	T1	36,55	21,39
	M2	32,15	15,91
	T2	32,65	10,83
HTOT 2ª avaliação	M1	36,95	13,54
	T1	24,50	13,88
	M2	15,25	10,62
	T2	12,70	6,53

Excetuando-se o grupo HT, todos os demais grupos apresentaram redução do tempo de chegada em determinados períodos estudados. O grupo controle apresentou redução do tempo apenas entre os períodos T1 e T2. O grupo HNT teve melhora do desempenho da memória entre o primeiro dia de teste (M1 e T1) em comparação com a manhã do segundo dia (M2).

O grupo HT não teve redução dos tempos de chegada entre todos os períodos estudados. O grupo HTOT, em sua primeira avaliação (HTOT1), mostrou redução do tempo de chegada a plataforma ao se considerar o primeiro período do primeiro dia (M1) em relação a todos os demais períodos de análise (T1, M2 e T2). Durante sua segunda avaliação, após a desobstrução do sistema, o grupo HTOT (HTOT2) apresentou melhora do desempenho da memória entre M1 e todos os demais períodos (T1, M2 e T2), bem como entre os períodos vespertinos (T1 e T2) (Tabela 9).

Tabela 9 – Comparação estatística do desempenho dos animais dentro do mesmo grupo, em diferentes períodos. M1, T1, M2 e T2 correspondem aos períodos matutino e vespertino de P15 e P16, respectivamente. M1', T1', M2' e T2' correspondem aos períodos matutino e vespertino de P19 e P20, respectivamente.

Comparações	Diferença	P-valor	IC 95%	
			LI	LS
(M1-T1) C	-2,95	0,54	-12,64	6,73
(M1-M2) C	4,50	0,35	-5,18	14,18
(M1-T2) C	8,00	0,10	-1,68	17,69
(T1-M2) C	7,45	0,13	-2,23	17,14
(T1-T2) C	10,95	0,03	1,26	20,64
(M2-T2) C	3,50	0,47	-6,19	13,19
(M1-T1) HNT	0,75	0,89	-9,86	11,36
(M1-M2) HNT	11,95	0,03	1,33	22,56
(M1-T2) HNT	9,40	0,08	-1,21	20,01
(T1-M2) HNT	11,20	0,04	0,59	19,26
(T1-T2) HNT	8,65	0,11	-1,96	21,64
(M2-T2) HNT	-2,55	0,63	-13,16	8,06
(M1-T1) HT	0,43	0,30	-4,29	13,65
(M1-M2) HT	-0,79	0,44	-5,51	12,43
(M1-T2) HT	3,68	0,08	-1,04	16,90
(T1-M2) HT	-1,22	0,79	-10,18	7,75
(T1-T2) HT	3,25	0,47	-5,72	12,22
(M2-T2) HT	4,47	0,32	-4,51	13,43
(M1-T1) HTOT-1	11,50	0,03	0,89	22,11
(M1-M2) HTOT-1	15,90	0,01	5,29	26,51
(M1-T2) HTOT-1	15,40	0,01	4,79	26,01
(T1-M2) HTOT-1	4,40	0,41	-6,21	15,01
(T1-T2) HTOT-1	3,90	0,46	-6,71	14,51
(M2-T2)HTOT-1	-0,50	0,92	-11,11	10,11
(M1'-T1') HTOT-2	12,45	0,01	2,92	21,98
(M1'-M2') HTOT-2	21,70	<0,01	12,17	31,23
(M1'-T2') HTOT-2	24,25	<0,01	14,72	33,78
(T1'-M2') HTOT-2	9,25	0,06	-0,28	17,78
(T1'-T2') HTOT-2	11,80	0,02	2,27	21,33
(M2'-T2')HTOT-2	2,55	0,59	-6,98	12,08

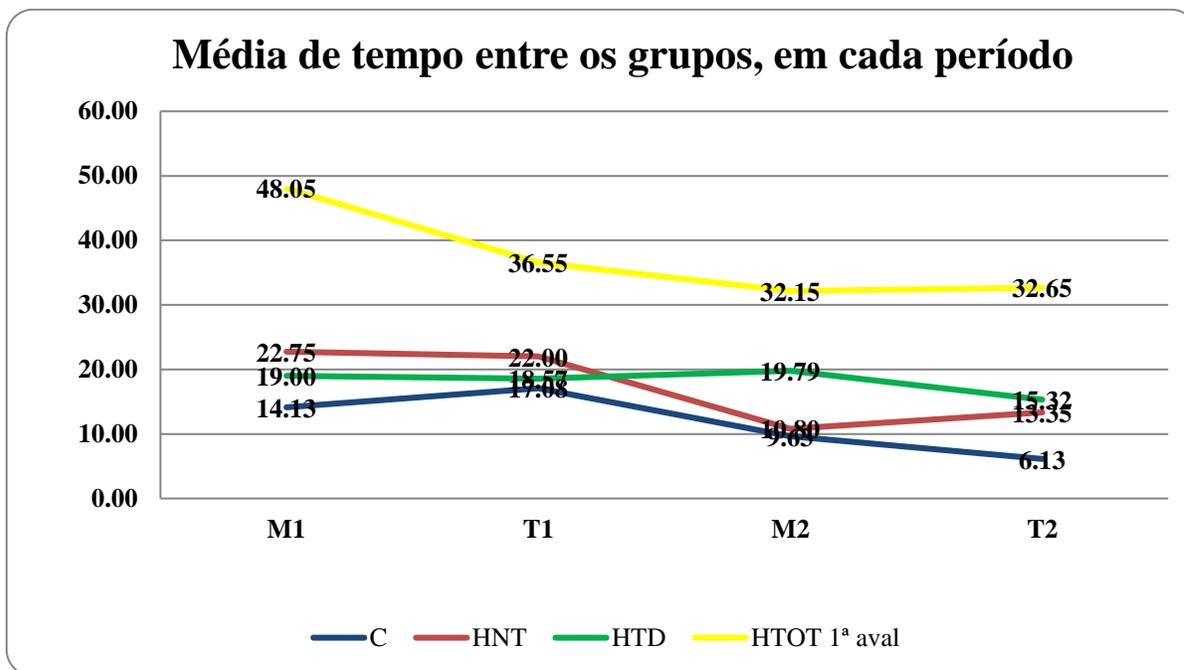


Figura 15 - Gráfico: Médias de tempo entre os diferentes grupos, nos diferentes períodos. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT1 – grupo hidrocefálico tratado, com *shunt* obstruído, primeira avaliação. Observa-se o melhor desempenho do grupo controle e o desempenho inferior do grupo HTOT em comparação aos demais grupos.

A análise comparativa dos desempenhos entre os diferentes grupos mostrou que o grupo HTOT, durante sua primeira avaliação, apresentou o maior tempo de chegada entre os demais animais estudados, sendo a diferença significativa em todos os períodos em comparação a todos os demais grupos (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação estatística dos desempenhos entre os diferentes grupos, em cada período. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT1 – grupo hidrocefálico tratado, com shunt obstruído, primeira avaliação.

Comparações	Diferença	p-valor	IC 95%	
			LI	LS
(C-HNT) M1	-8,62	0,16	-20,86	3,61
(C-HT) M1	-9,14	0,10	-20,37	2,12
(C-HTOT1) M1	-33,92	<0,01	-46,16	-21,68
(HNT-HT) M1	-0,50	0,93	-12,34	11,34
(HNT-HTOT1) M1	-23,55	<0,01	-38,08	-12,51
(HT-HTOT1) M1	-24,80	<0,01	-36,63	-12,96
(C-HNT) T1	-4,91	0,42	-17,15	7,32
(C-HT) T1	-1,49	0,79	-12,73	9,76
(C-HTOT1) T1	-19,47	0,01	-31,73	7,23
(HNT-HT) T1	3,42	0,56	-8,40	15,26
(HNT-HTOT1) T1	-14,55	0,03	-27,33	1,77
(HT-HTOT1) T1	-17,98	0,04	-29,81	6,14
(C-HNT) M2	-1,17	0,84	-13,41	11,06
(C-HT) M2	-10,16	0,07	-21,40	1,08
(C-HTOT1) M2	-22,52	<0,01	-34,76	10,28
(HNT-HT) M2	-8,98	0,13	-20,82	2,85
(HNT-HTOT1) M2	-21,35	0,01	-34,13	8,57
(HT-HTOT1) M2	-12,36	0,04	-24,20	-0,53
(C-HNT) T2	-7,22	0,24	-19,47	5,01
(C-HT) T2	-9,20	0,10	-20,44	2,05
(C-HTOT1) T2	-26,52	<0,01	-38,76	-14,28
(HNT-HT) T2	-1,97	0,74	-13,80	9,86
(HNT-HTOT1) T2	-19,30	<0,01	-32,08	-6,51
(HT-HTOT1) T2	-17,32	<0,01	-29,16	-5,49

Após realização do último procedimento no Grupo HTOT (desobstrução do sistema), os animais foram submetidos a nova avaliação. Observou-se redução do tempo de chegada em comparação a primeira avaliação em todos os períodos considerados (Figura 16), sendo a diferença significativa apenas nos períodos matutino e vespertino do segundo dia (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparação estatística da diferença de desempenho do grupo HTOT entre a primeira (realizadas no P15 e P16) e a segunda (realizadas no P19 e P20) avaliações.

Comparações	Diferença	p-valor	IC 95%	
			LI	LS
(HTOT1-HTOT2) M1	11,10	0,10	-7,81	30,01
(HTOT1-HTOT2) T1	12,05	0,16	-14,24	38,34
(HTOT1-HTOT2) M2	16,90	0,04	-2,82	36,62
(HTOT1-HTOT2) T2	19,95	<0,01	6,91	32,99

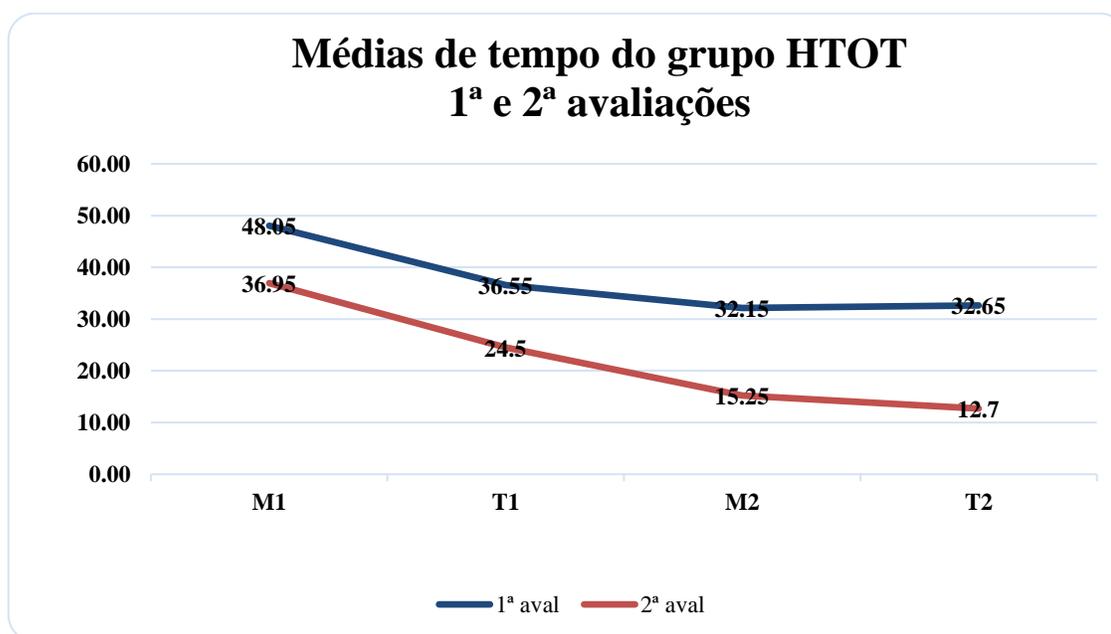


Figura 16 - Gráfico: Médias de tempo do grupo HTOT, nas duas avaliações realizadas. Observa-se a melhora do desempenho da memória após a desobstrução do sistema.

Apesar da melhora do desempenho do grupo HTOT entre a primeira e segunda avaliações (Figura 18), ainda houve diferença entre os tempos de chegada deste grupo em relação a todos os demais grupos em M1 (Tabela 12). O grupo HTOT teve tendência a menor tempo de chegada à plataforma em comparação aos grupos HNT e HT no último período (T2) (Figura 17).

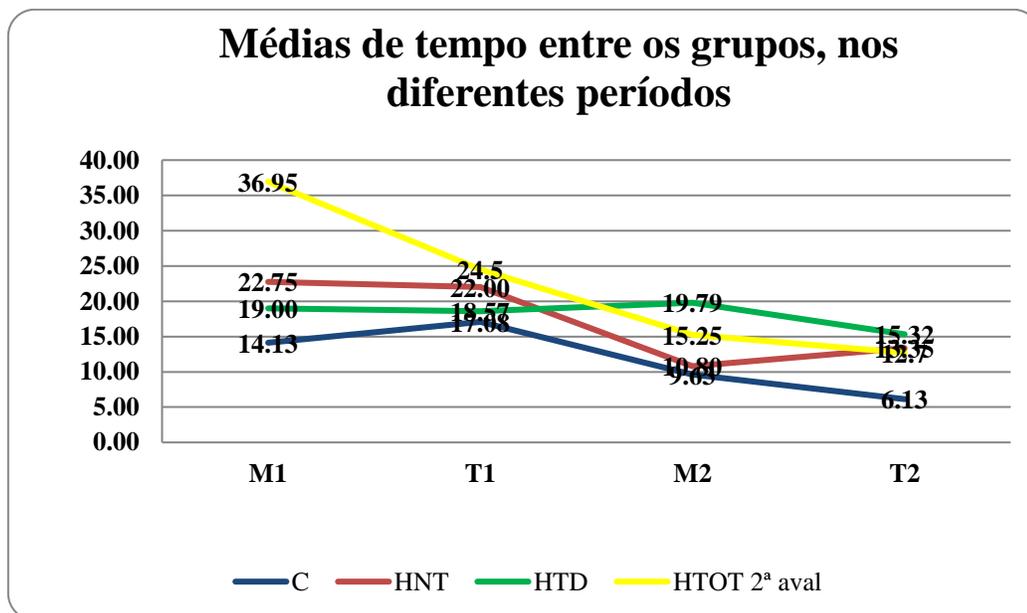


Figura 17 - Gráfico 9: Médias de tempo entre os diferentes grupos, nos diferentes períodos. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT1 – grupo hidrocefálico tratado, com *shunt* obstruído, segunda avaliação. Houve redução do tempo de chegada do grupo HTOT em comparação a sua primeira avaliação.

Tabela 12 – Comparação estatística dos desempenhos entre os diferentes grupos, em cada período. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT2 – grupo hidrocefálico tratado, com *shunt* obstruído, segunda avaliação (após desobstrução).

Comparações	Diferença	p-valor	IC 95%	
			LI	LS
(C-HTOT2) M1	-22,82	<0,01	-33,15	-12,10
(HNT-HTOT2) M1	-14,20	0,01	-25,40	-2,30
(HT-HTOT2) M1	-13,07	0,01	-24,07	-3,33
(C-HTOT2) T1	-7,41	0,17	-18,14	3,31
(HNT-HTOT2) T1	-2,50	0,65	-13,70	8,70
(HT-HTOT2) T1	-5,93	0,25	-16,30	4,44
(C-HTOT2) M2	-5,62	0,30	-16,35	5,10
(HNT-HTOT2) M2	-4,45	0,43	-15,65	6,75
(HT-HTOT2) M2	4,53	0,38	-5,83	14,91
(C-HTOT2) T2	-6,57	0,22	-17,30	4,15
(HNT-HTOT2) T2	0,65	0,90	-10,55	11,85
(HT-HTOT2) T2	2,62	0,61	-7,75	12,99

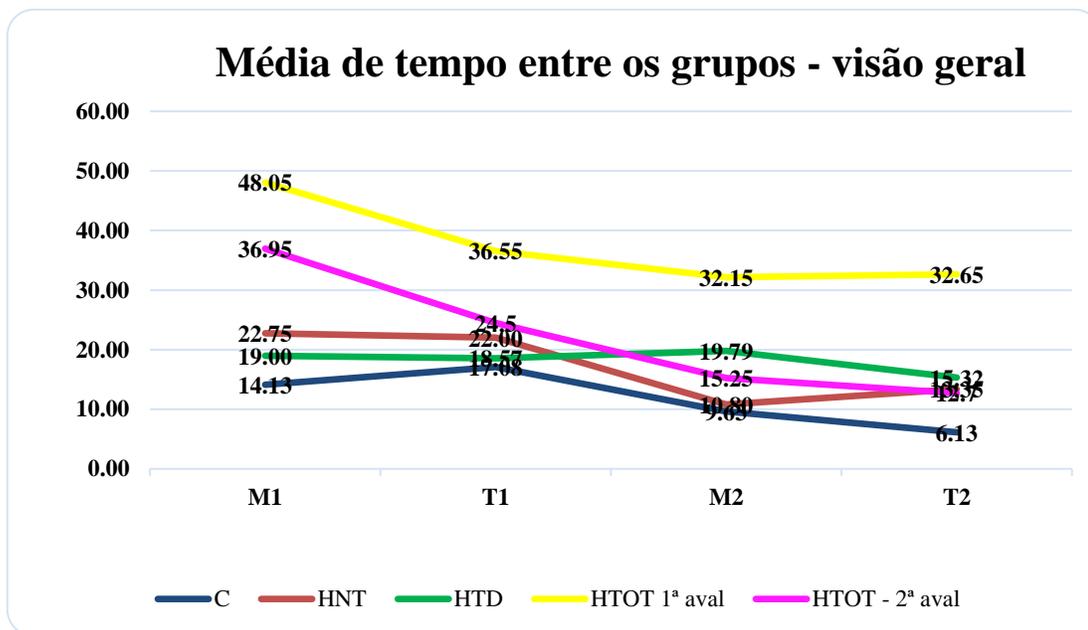


Figura 18 - Gráfico: Médias de tempo entre os diferentes grupos, nos diferentes períodos. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT1 – grupo hidrocefálico tratado, com shunt obstruído.

6.3 Avaliações histológicas

6.3.1 Coloração por Hematoxilina-eosina

A comparação entre as lâminas dos grupos revelou que o corpo caloso dos animais controle (C) apresenta epêndima íntegro, constituído por epitélio de células cuboidais simples, com núcleos centralizados e alinhados. As fibras do corpo caloso não apresentam estiramento. O grupo hidrocefálico não tratado (HNT) tem seu epêndima constituído por células achatadas, com pontos onde é evidente a descontinuidade do epitélio. As fibras do corpo caloso apresentam estiramento e edema. Nos grupos hidrocefálico tratado (HT) e hidrocefálico tratado, com *shunt* obstruído (HTOT), por sua vez, pode-se observar discreta redução do estiramento das fibras e do edema entre elas, além de uma maior regularidade nas células do revestimento ependimário em comparação ao grupo HNT (Figura 19).

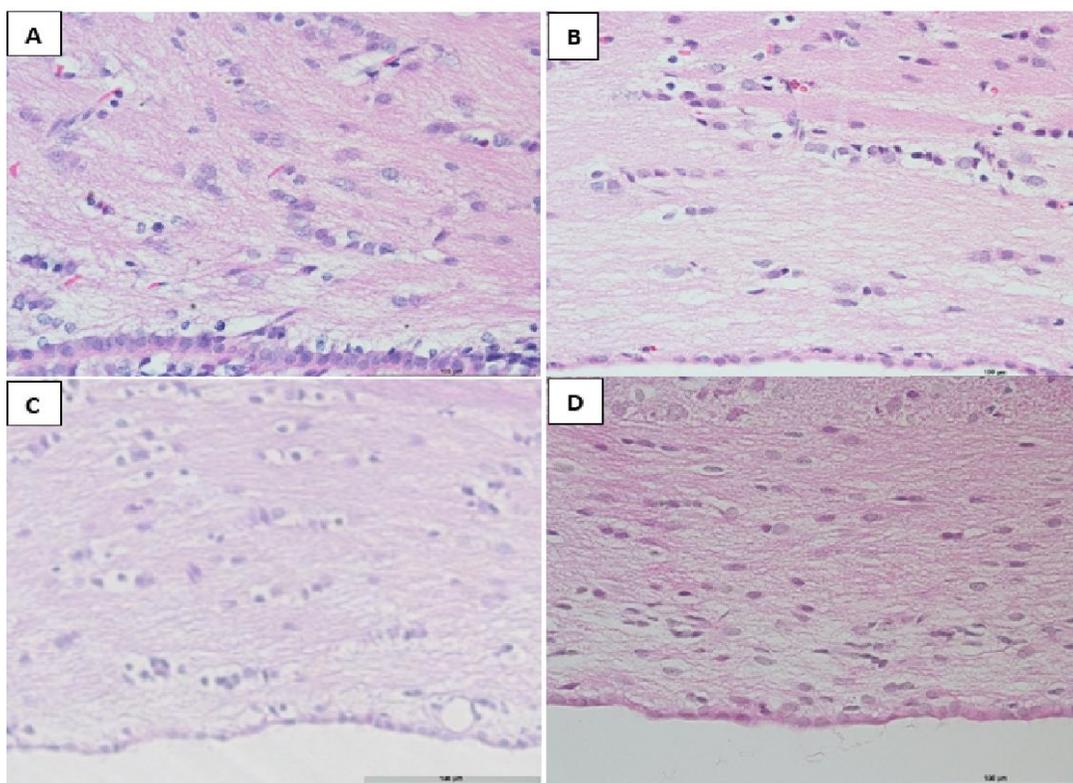


Figura 19 - Fotomicrografias do corpo caloso, coradas com hematoxilina-eosina. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado, com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

A figura abaixo (Figura 20) sumariza os achados histológicos na matriz germinativa, para cada grupo: observa-se rica densidade celular no grupo controle, além de epêndima íntegro, cujas células apresentam núcleos arredondados. Os demais grupos apresentam redução da densidade celular, além de descontinuidade e irregularidade endimária. Esses achados são mais evidentes no grupo hidrocefálico não tratado.

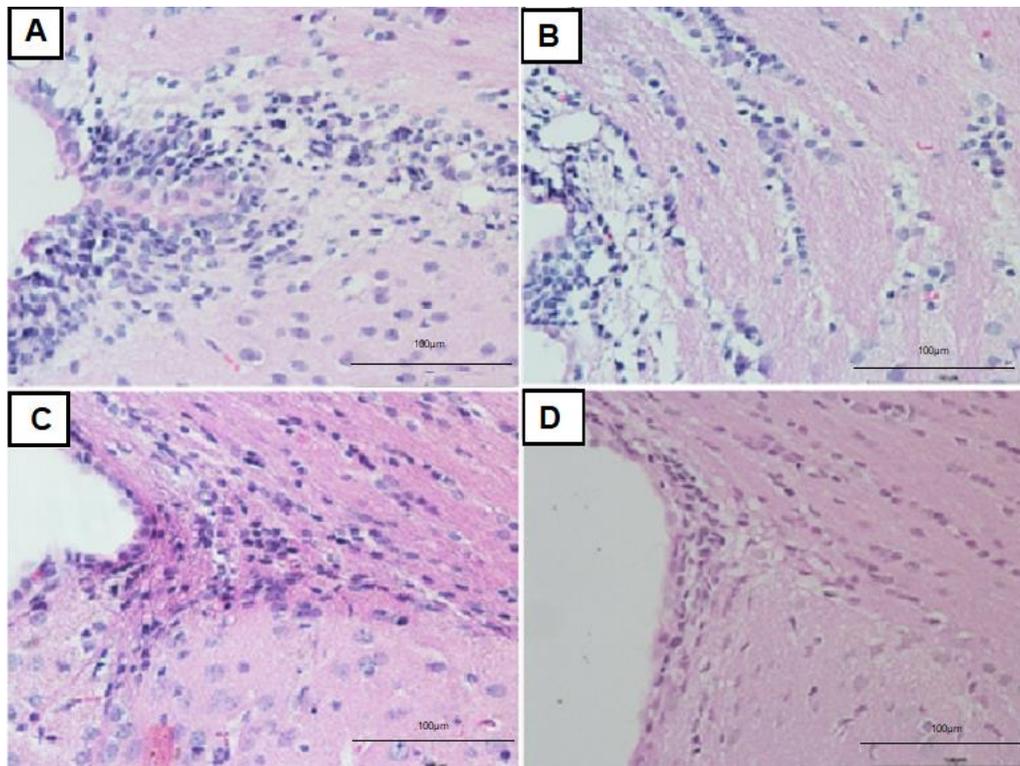


Figura 20 - Fotomicrografias da matriz germinativa, coradas com hematoxilina-eosina. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D – hidrocefálico tratado, com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

No córtex adjacente ao corpo caloso as diferenças entre os grupos foram menos evidentes. Em todos os grupos houve preservação da citoarquitetura, com áreas esparsas de edema (Figura 21). A avaliação do hipocampo mostrou claramente o aumento do corno temporal do ventrículo tanto nos animais com hidrocefalia não tratada como nos grupos submetidos a algum tipo de tratamento cirúrgico (Figura 22). Quando analisadas individualmente, as diferenças na citoarquitetura nas subáreas hipocâmpais foram menos evidentes entre os grupos (Figura 23).

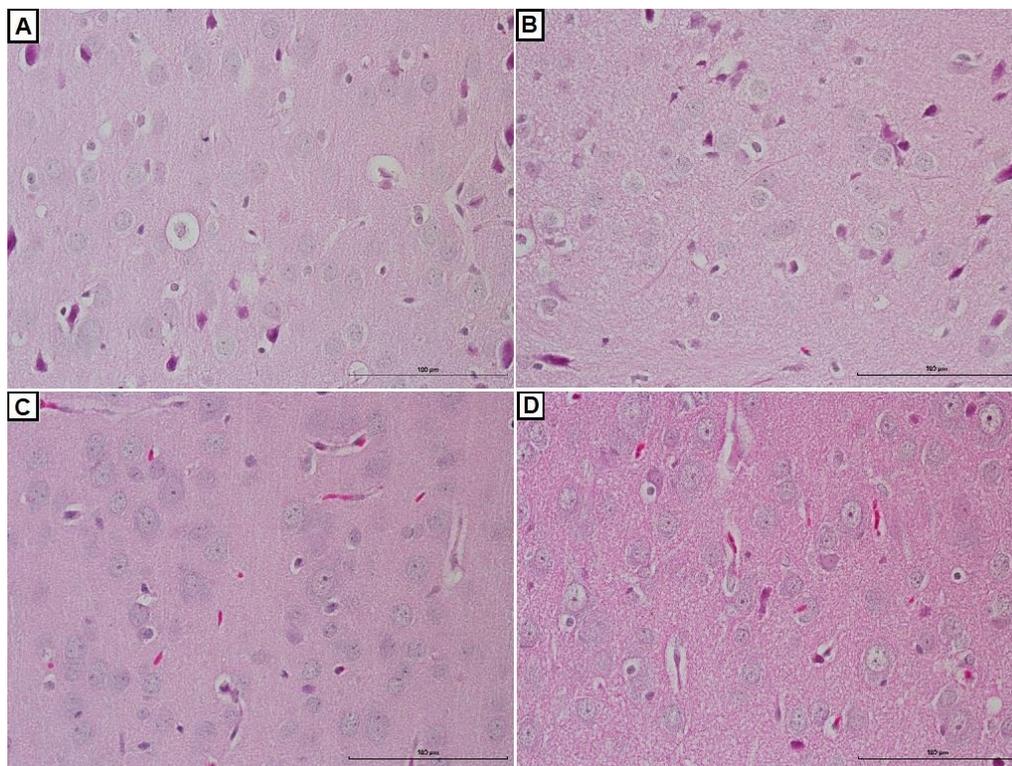


Figura 21 - Fotomicrografias do córtex adjacente ao corpo caloso, coradas com hematoxilina-eosina. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D – hidrocefálico tratado, com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

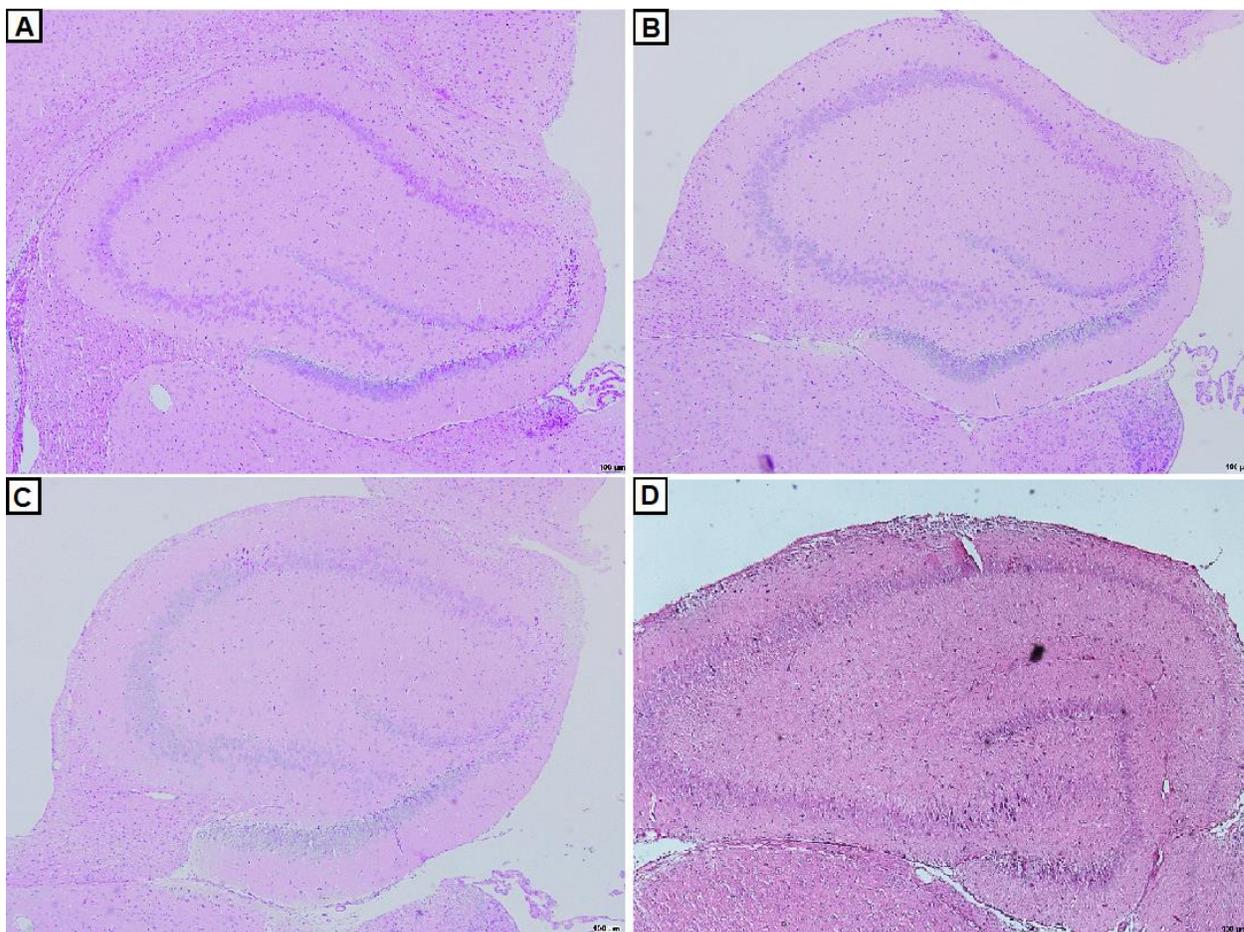


Figura 22 - Fotomicrografias do hipocampo, coradas com hematoxilina-eosina. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D – hidrocefálico tratado, com shunt obstruído. Magnificação de 4x.

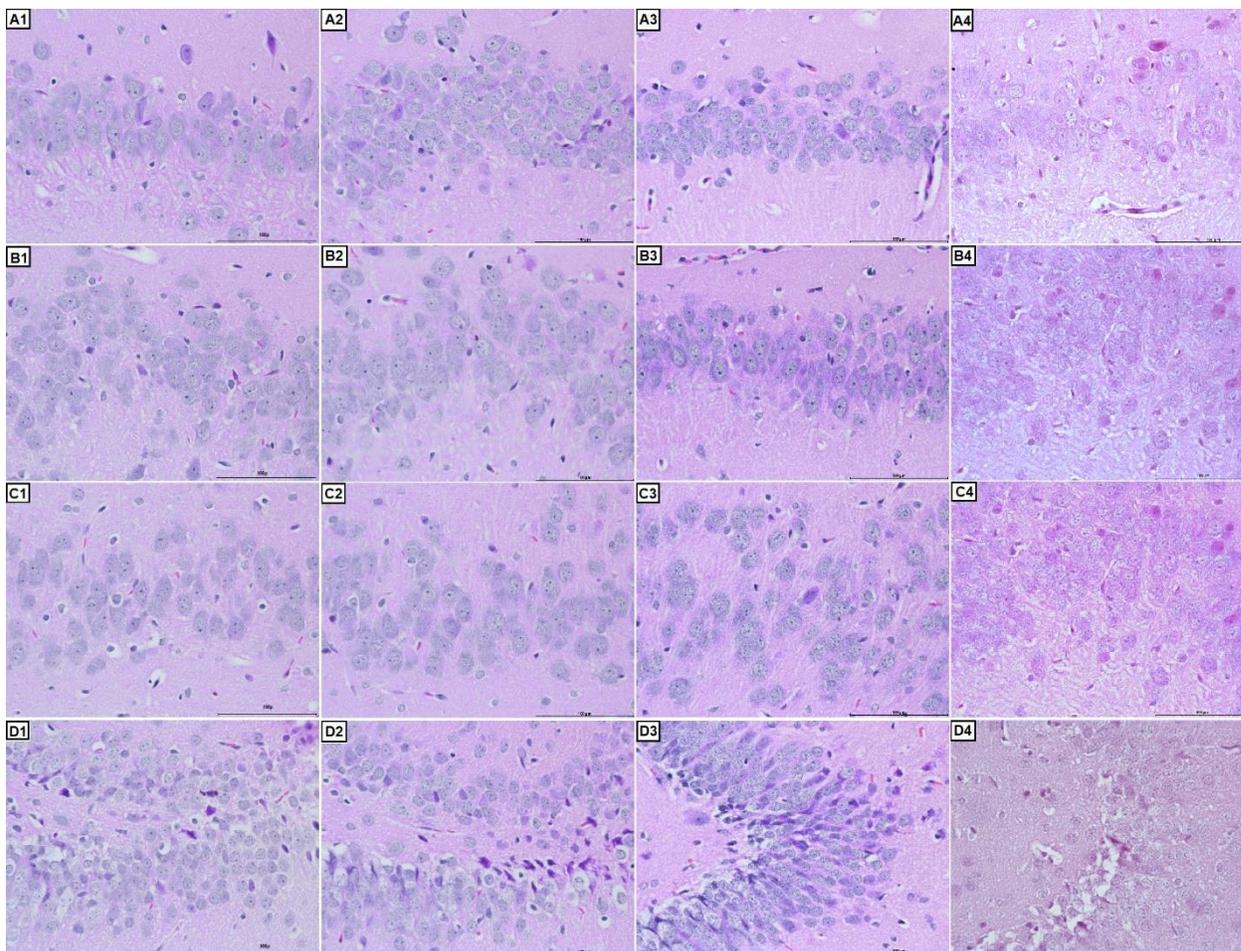


Figura 23 - Fotomicrografias das subáreas do hipocampo, CA1, CA2, CA3 e giro dentado, representadas nas colunas, da esquerda para direita, coradas com hematoxilina-eosina. A1, A2, A3, A4 - grupo controle; B1, B2, B3, B4 - hidrocefálico não tratado; C1, C2, C3, C4 - hidrocefálico tratado e D1, D2, D3, D4 - hidrocefálico tratado com shunt obstruído.. Magnificação de 40x.

6.3.2 Análise por luxol fast blue – LFB

A análise qualitativa mostrou que houve diferença na espessura do corpo caloso entre os grupos (Figuras 24 e 25), sendo o grupo controle aquele com maior espessura em comparação todos os demais grupos, conforme demonstrado na tabela abaixo (Tabela 13). A intensidade da marcação foi menor no grupo com hidrocefalia não tratada.

Tabela 13 - Média e espessura do corpo caloso de cada grupo. C – grupo controle; HNT – grupo hidrocefálico não tratado; HT – grupo hidrocefálico tratado; HTOT – grupo hidrocefálico tratado, com shunt obstruído.

Grupos	Espessura média (μm)	Desvio padrão
Controle	365.10	20.06
HNT	110.78	8.27
HTD	249.36	51.15
HTOT	232.73	7.18

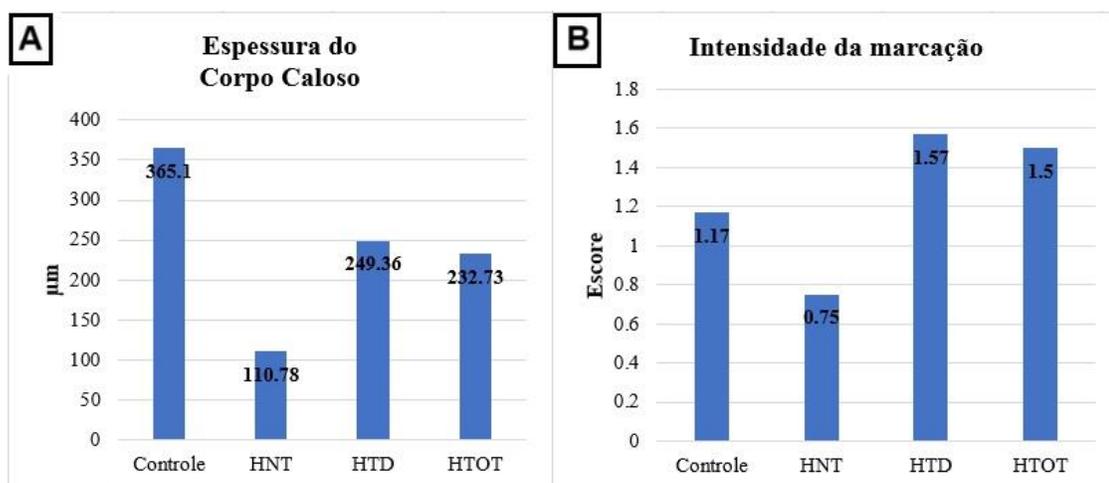


Figura 24 - Gráfico: Análise comparativa da média da espessura do corpo caloso entre os diferentes grupos (A) e da intensidade da marcação do corpo caloso (B). Pode-se observar a maior espessura do grupo controle em relação aos demais grupos.

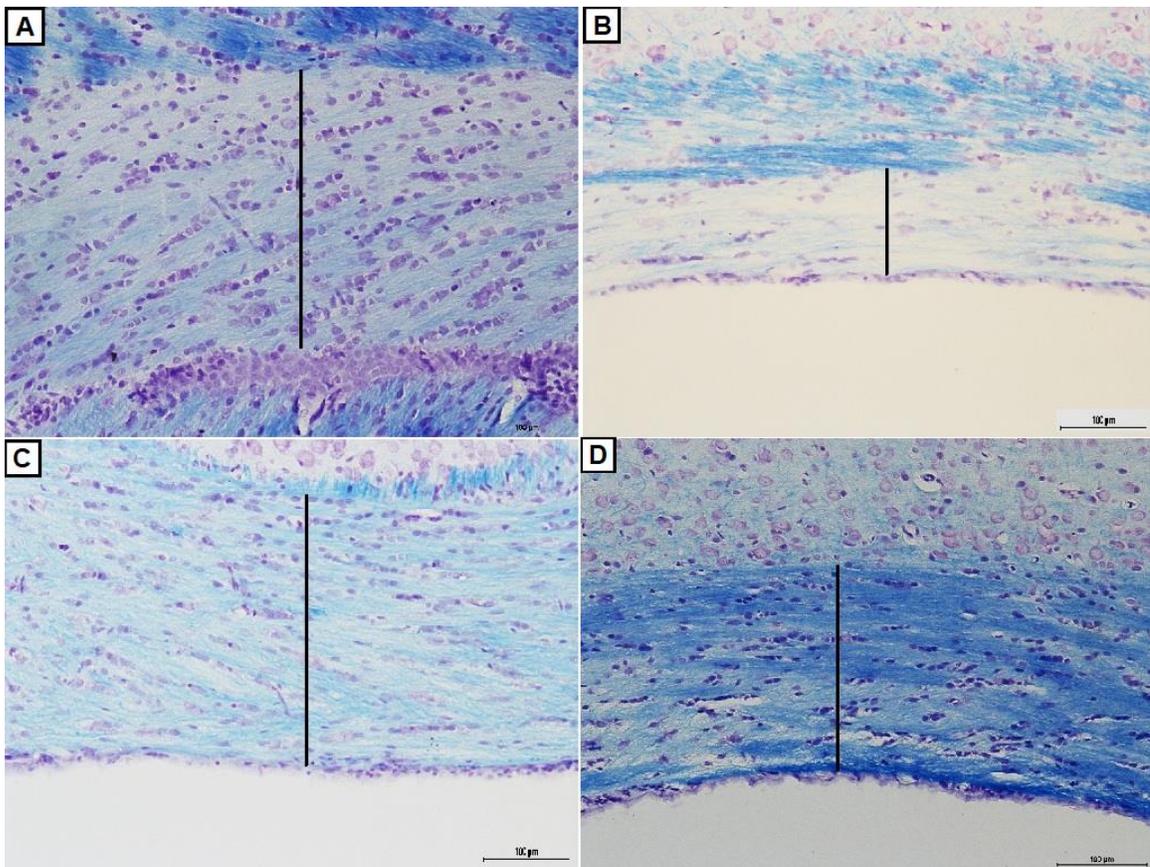


Figura 25 - Fotomicrografias do corpo caloso, corados com *luxol fast blue*. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D – hidrocefálico tratado, com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

A análise estatística comprovou a diferença da espessura média do corpo caloso no grupo controle em relação aos demais, tendo este grupo a maior espessura em comparação aos grupos HNT ($p < 0,01$), HTD ($p = 0,01$) e HTOT ($p = 0,03$). Foi observada também menor espessura do corpo caloso no grupo hidrocefálico não tratado em relação ao grupo HTD ($p = 0,04$) e HTOT ($p = 0,04$). Não houve diferença entre os grupos cirúrgicos (HTD e HTOT). Apesar da menor intensidade encontrada no grupo hidrocefálico não tratado, não houve diferença estatística entre os achados.

6.4 Análises imunoistoquímicas

6.4.2 Avaliação imunoistoquímica por GFAP

Na avaliação qualitativa do corpo caloso, pode-se observar que o grupo HTOT apresentou reação astrocitária mais intensa com relação aos demais grupos, com grande número de astrócitos

por área, intensamente marcados, com prolongamentos grosseiros e irregulares. Foram evidenciados astrócitos em todos os demais grupos, ficando evidente, entretanto, que os astrócitos no grupo controle apresentam prolongamentos finos e pouco visíveis (Figuras 26 e 27). A densidade e intensidade da marcação astrocitária nos grupos HNT e HT foram semelhantes, apesar das diferenças na citoarquitetura evidenciada pelos estudos com hematoxilina-eosina anteriormente descritas.

Apesar das diferenças entre os grupos observadas na avaliação qualitativa do corpo caloso, a análise estatística não encontrou diferença na reação astrocitária nesta região do encéfalo ($p=0,22$ e $p=0,20$ na análise da densidade celular e intensidade da marcação, respectivamente).

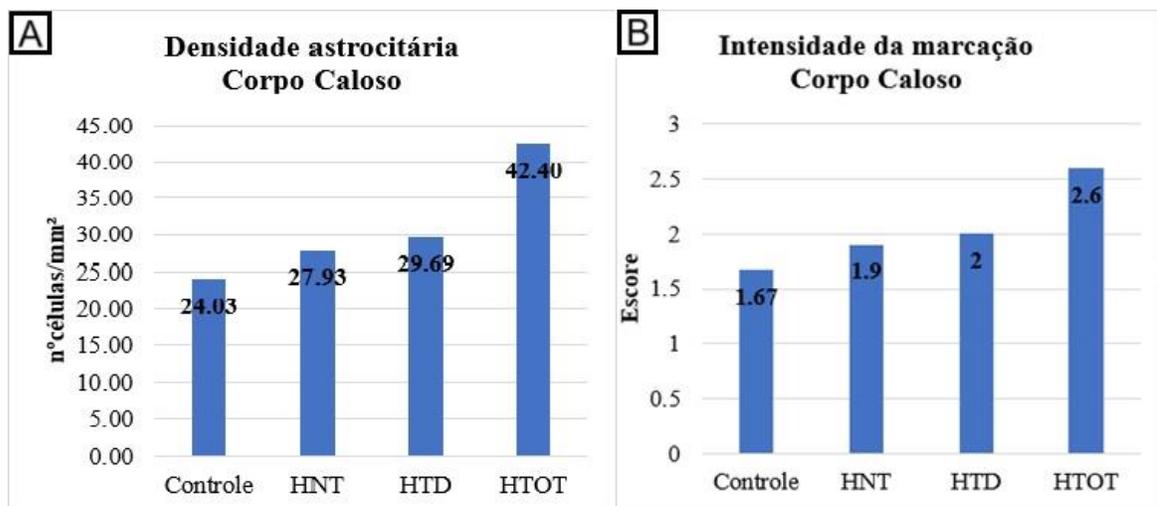


Figura 26 - Gráfico: Análise da reação astrocitária no corpo caloso: A – média do número de astrócitos por mm² em cada grupo. B – média do escore atribuído à intensidade da marcação em cada grupo. O grupo HTOT apresentou maior grau de reação astrocitária em comparação aos demais grupos.

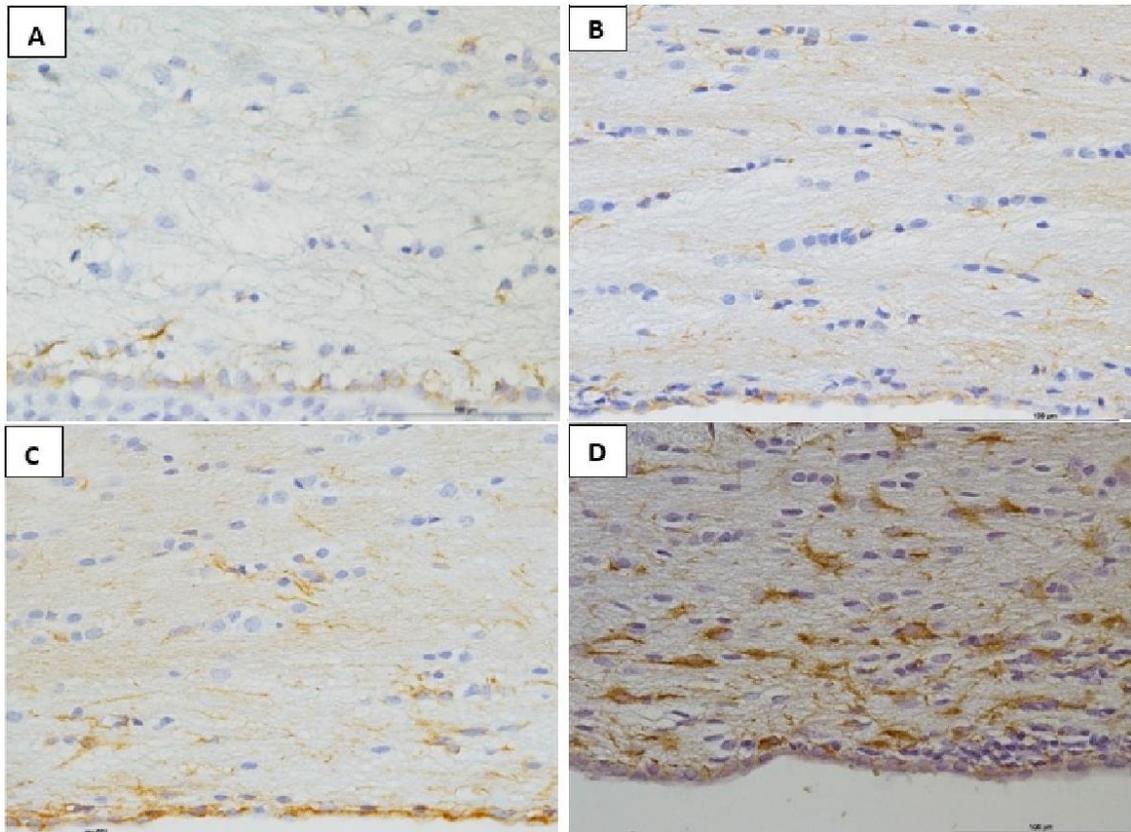


Figura 27 - Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP no corpo caloso. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x. Nota-se a evidente reação astrocitária nos grupos HTD e HTOT.

Na matriz germinativa, as diferenças qualitativas entre os grupos também foram evidentes. Apesar da maior densidade celular observada no grupo controle em comparação ao grupo HNT, os astrócitos neste grupo apresentam prolongamentos mais espessos e evidentes entre as células que compõem a matriz germinativa. Nota-se novamente a redução do volume celular no grupo não tratado em comparação aos demais grupos. Os grupos HT e HTOT apresentaram maior número e maior intensidade da marcação, evidenciando intensa reação astrocitária na matriz germinativa destes animais (Figuras 28 e 29).

A análise estatística dos dados comprovou uma maior intensidade da reação astrocitária no grupo HTOT ($p=0,03$) em relação ao grupo controle ($p=0,01$) e ao grupo HTD ($p=0,02$). Houve ainda uma tendência neste grupo da presença de maior número de astrócitos reativos em relação aos demais grupos ($p=0,06$).

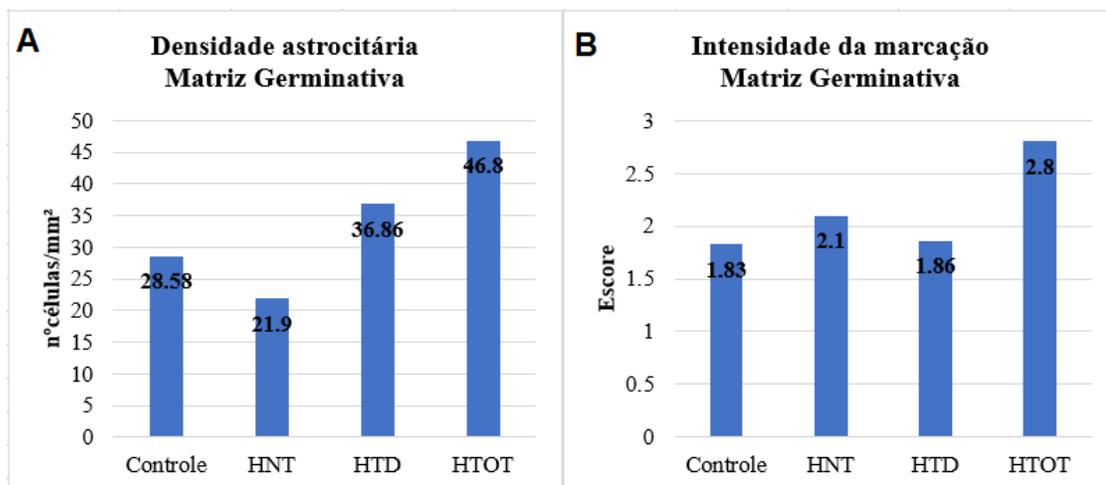


Figura 28 - Gráfico: Análise da reação astrocitária na matriz germinativa: A – média do número de astrócitos por mm² em cada grupo. B – média do escore atribuído à intensidade da marcação em cada grupo.

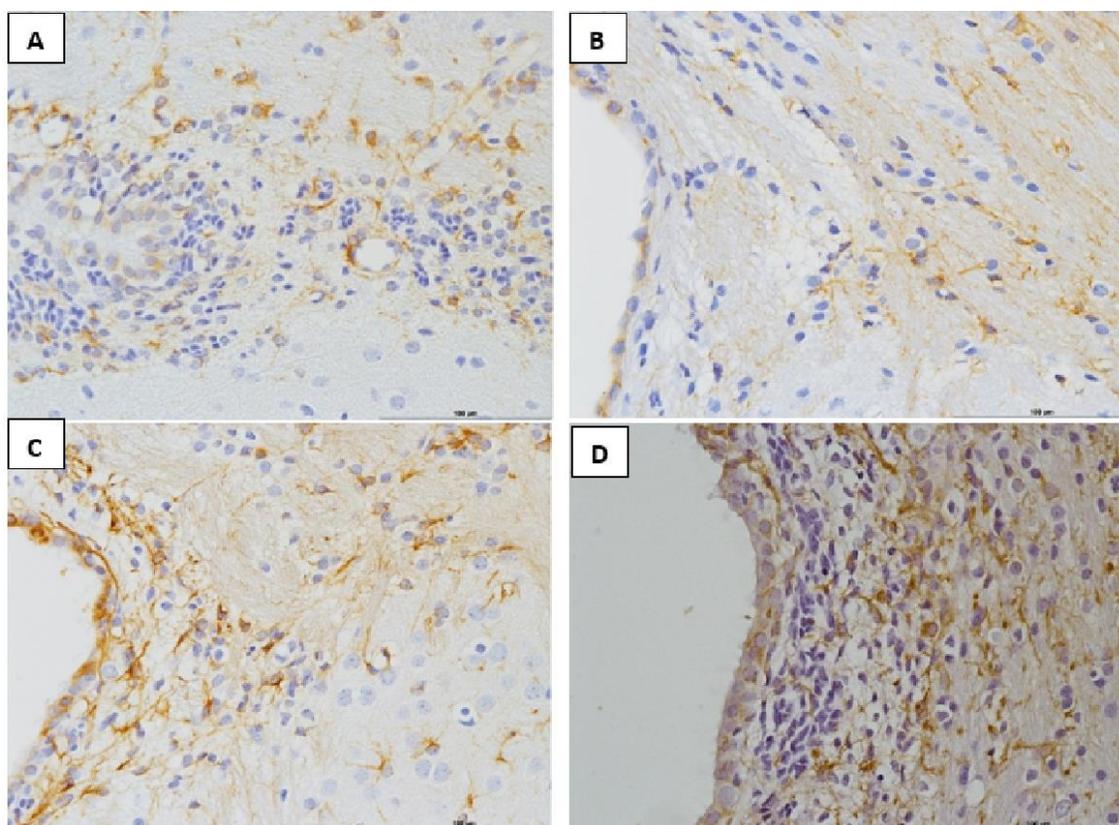


Figura 29 - Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP na matriz germinativa. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

No córtex cerebral adjacente ao corpo caloso (CTx_CC), a reação astrocitária foi menos intensa no grupo controle, que apresentou não apenas um menor de células por área analisada, como também prolongamentos menores e menos visíveis (Figuras 30 e 31).

Esses achados foram comprovados por análise estatística: o grupo controle apresentou menor densidade celular ($p < 0,01$) e menor intensidade da marcação ($p = 0,03$) em relação aos demais grupos.

O grupo HTOT, assim como nas demais áreas do encéfalo analisadas, apresentou maior densidade e intensidade da reação astrocitária em comparação aos demais grupos. Entretanto, a análise dos dados não encontrou significância estatística para os achados.

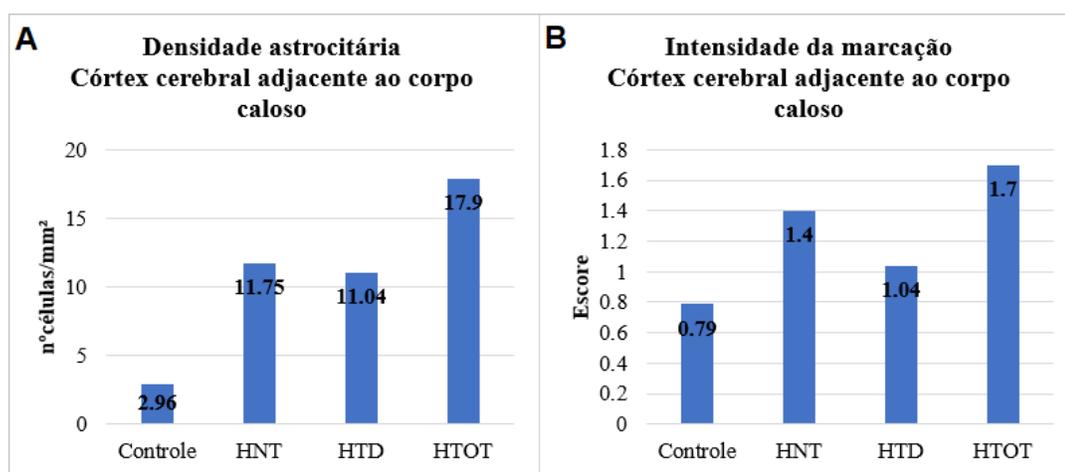


Figura 30 - Gráfico : Análise da reação astrocitária no córtex adjacente ao corpo caloso: A – média do número de astrócitos por mm² em cada grupo. B – média do escore atribuído à intensidade da marcação em cada grupo.

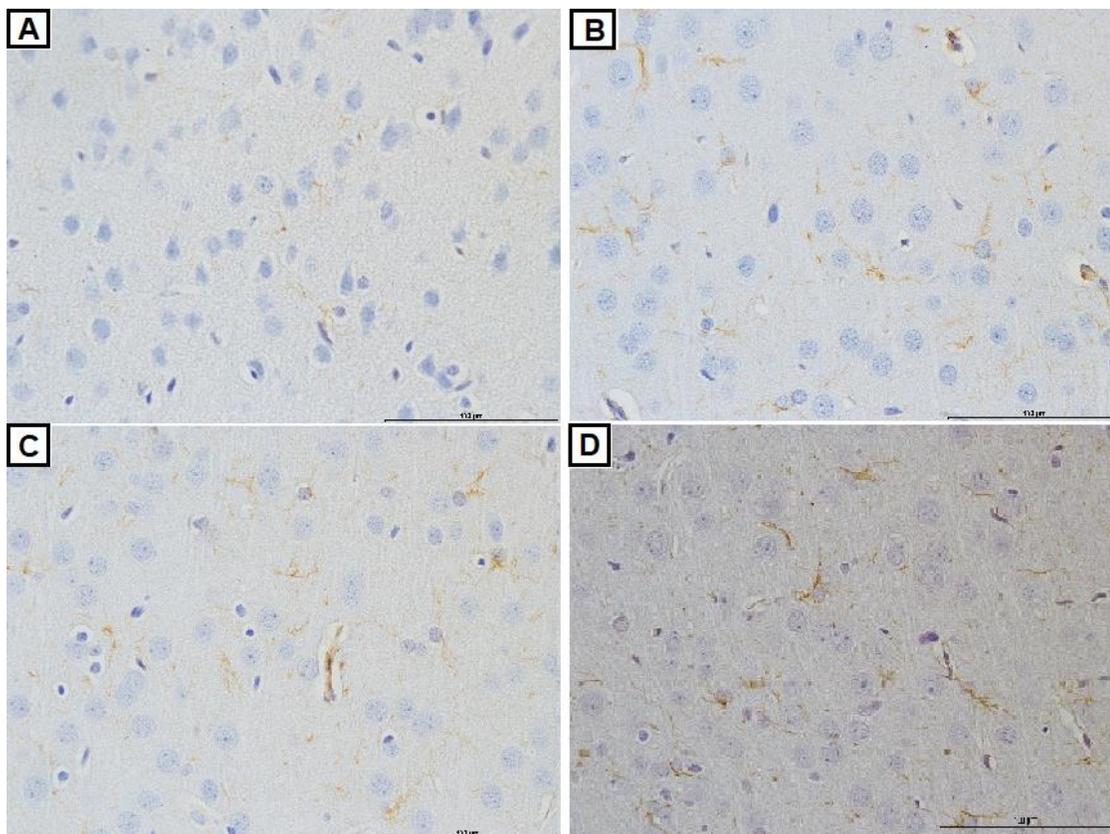
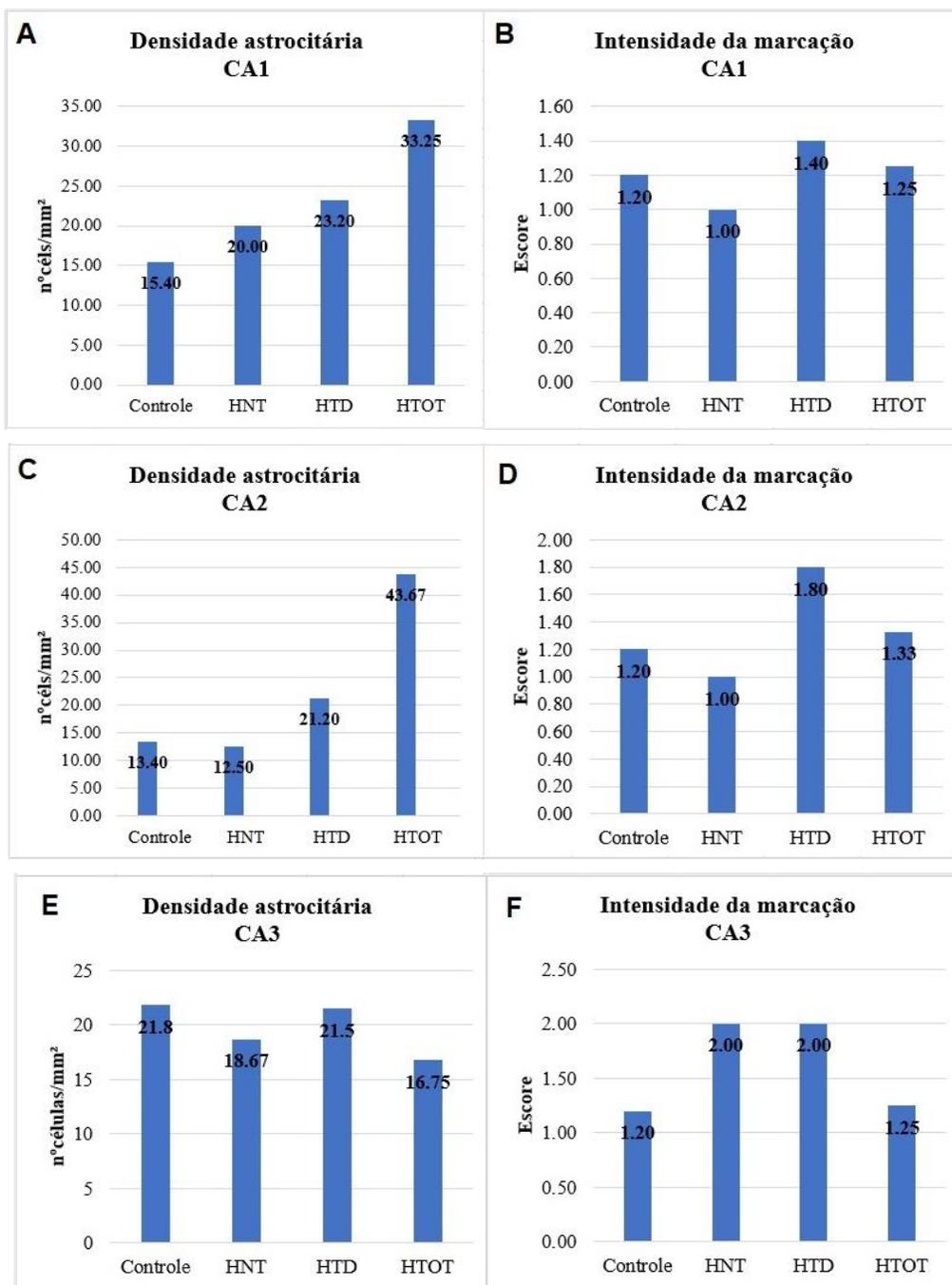


Figura 31 - Fotomicrografias da imunomarcação por GFAP no córtex adjacente ao corpo caloso. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnifica o de 40x.

Foi analisada também a rea o astrocitária nas subáreas do hipocampo. O grupo HTOT apresentou um grande número de astrócitos reativos nas subáreas CA1, CA2 e giro denteado, em contraste com a densidade celular demonstrada no grupo controle. A intensidade da marca o foi variada entre os grupos nas diferentes regiões (Figuras 32 e 33). A análise estatística dos dados não encontrou diferença entre os achados anteriormente descritos.



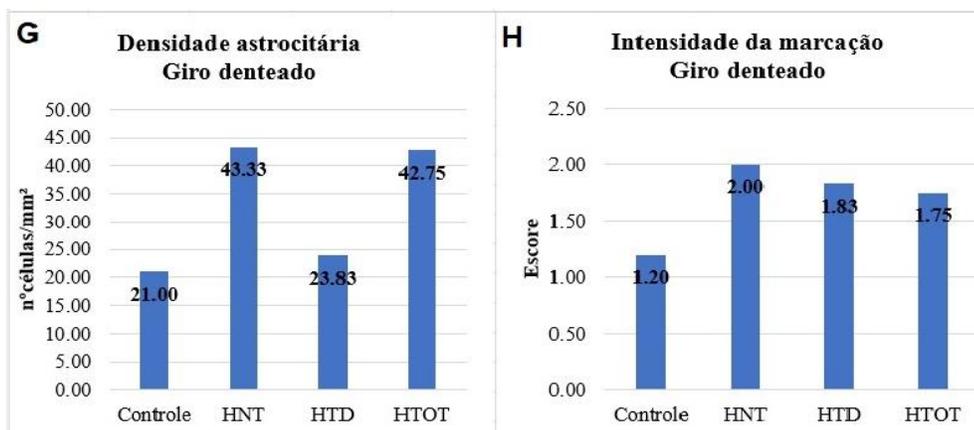


Figura 32 - Gráfico : Análise da reação astrocitária nas subáreas do hipocampo, CA1, CA2, CA3 e Giro denteado: A, C, E, G – média do número de astrócitos por mm² em cada grupo. B, D, F, H – média do escore atribuído à intensidade da marcação em cada grupo.

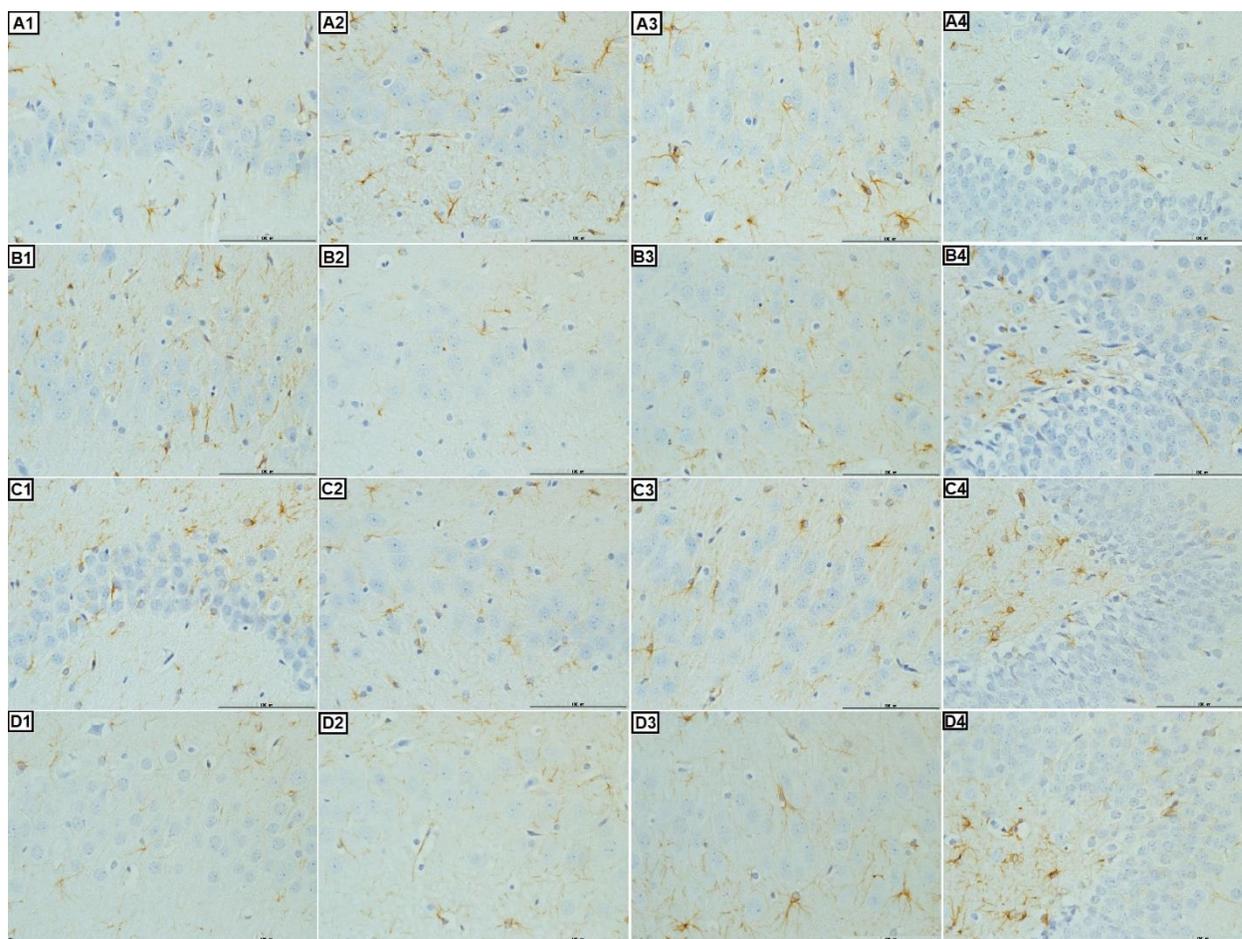


Figura 33 - Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP nas subáreas do hipocampo – CA1, CA2, CA3 e giro denteado, representadas nas colunas, da esquerda para direita. A1, A2, A3, A4 - grupo controle; B1, B2, B3, B4 -

hidrocefálico não tratado; C1, C2, C3, C4 - hidrocefálico tratado e D1, D2, D3, D4 - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

6.4.3 Avaliação imunoistoquímica por Caspase-3

A análise das lâminas com imunomarcção para Caspase-3 mostrou alterações contrastantes entre as regiões analisadas. No córtex cerebral adjacente ao corpo caloso (CTx_CC), pode-se notar uma maior densidade de células apoptóticas no grupo HTOT, seguido do grupo controle. No córtex cerebral adjacente ao hipocampo (CTx_H), por sua vez, notou-se maior número de células em apoptose no grupo HTD, seguindo do grupo HNT (Figuras 34 e 35).

A análise estatística dos dados não encontrou diferenças entre os achados, em ambas as regiões estudadas ($p=0,09$ e $p=0,44$ na análise do CTx_CC e CTx_H, respectivamente).

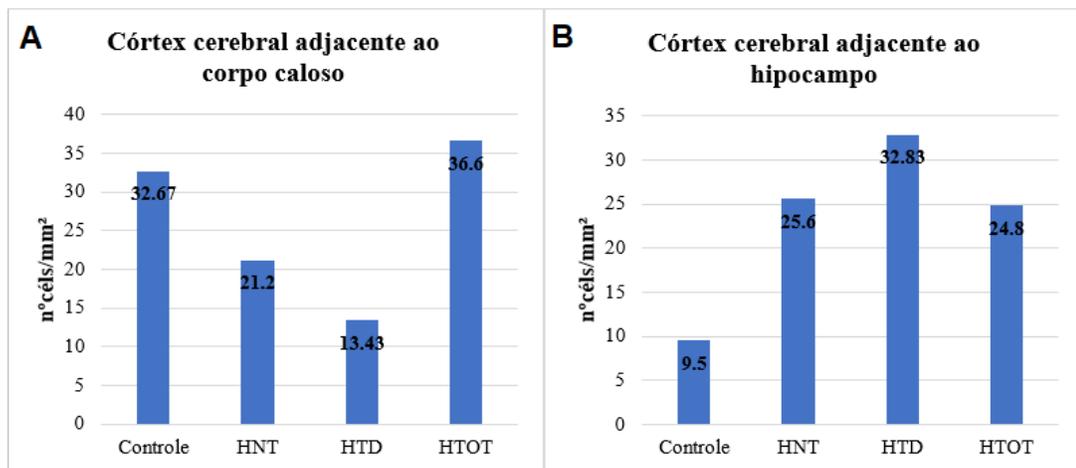


Figura 34 - Gráfico : Análise da densidade celular das células com marcação para caspase: A – Média do número de células marcadas por mm² no córtex dorsal ao corpo caloso. B – Média do número de células marcadas por mm² no córtex dorsal ao hipocampo.

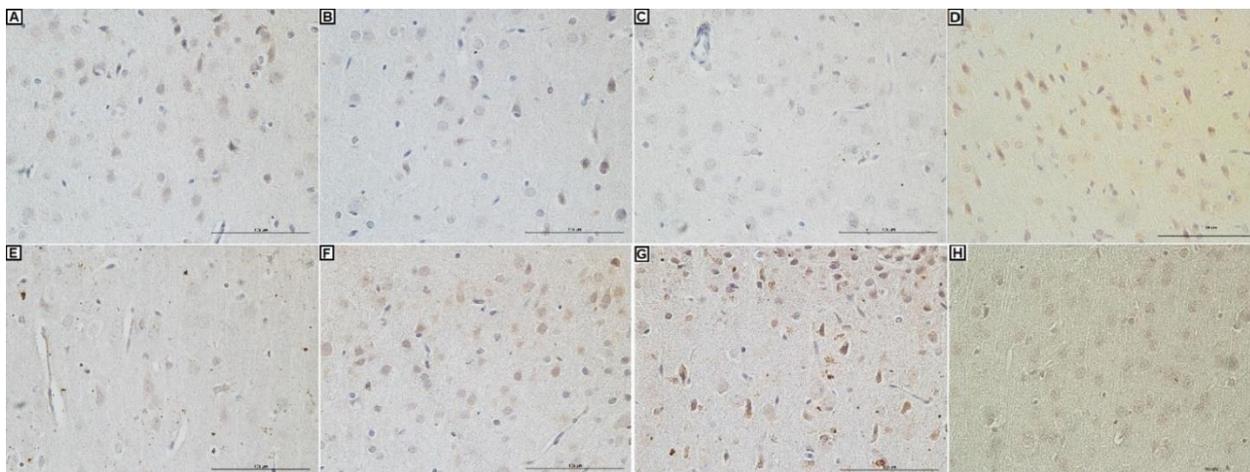


Figura 35 - Fotomicrografias da imunomarcação por Caspase no córtex dorsal ao corpo caloso (primeira linha) e no córtex dorsal ao hipocampo (segunda linha). A, E - grupo controle; B, F - hidrocefálico não tratado; C, G - hidrocefálico tratado e D, H - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

6.4.4 Avaliação imunoistoquímica por COX-2

A avaliação qualitativa das lâminas em que foi realizado estudo imunoistoquímico para COX-2 demonstrou uma grande porcentagem de células marcadas no grupo HTOT em comparação aos demais grupos, tanto no corpo caloso quanto na matriz germinativa (Figuras 36, 37 e 38). A análise estatística comprovou esses achados apenas na matriz germinativa ($p=0,02$), sendo a porcentagem no grupo HTOT maior em relação ao grupo controle ($p<0,01$) e ao grupo HTD ($p=0,04$).

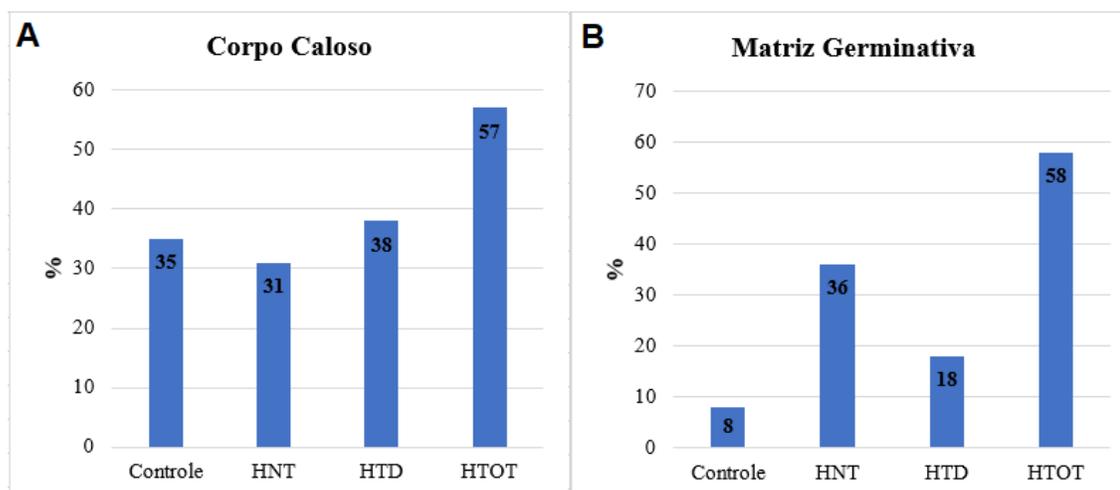


Figura 36 - Gráfico: Análise da porcentagem de células com imunomarcção para COX-2 no corpo caloso (A) e na matriz germinativa (B).

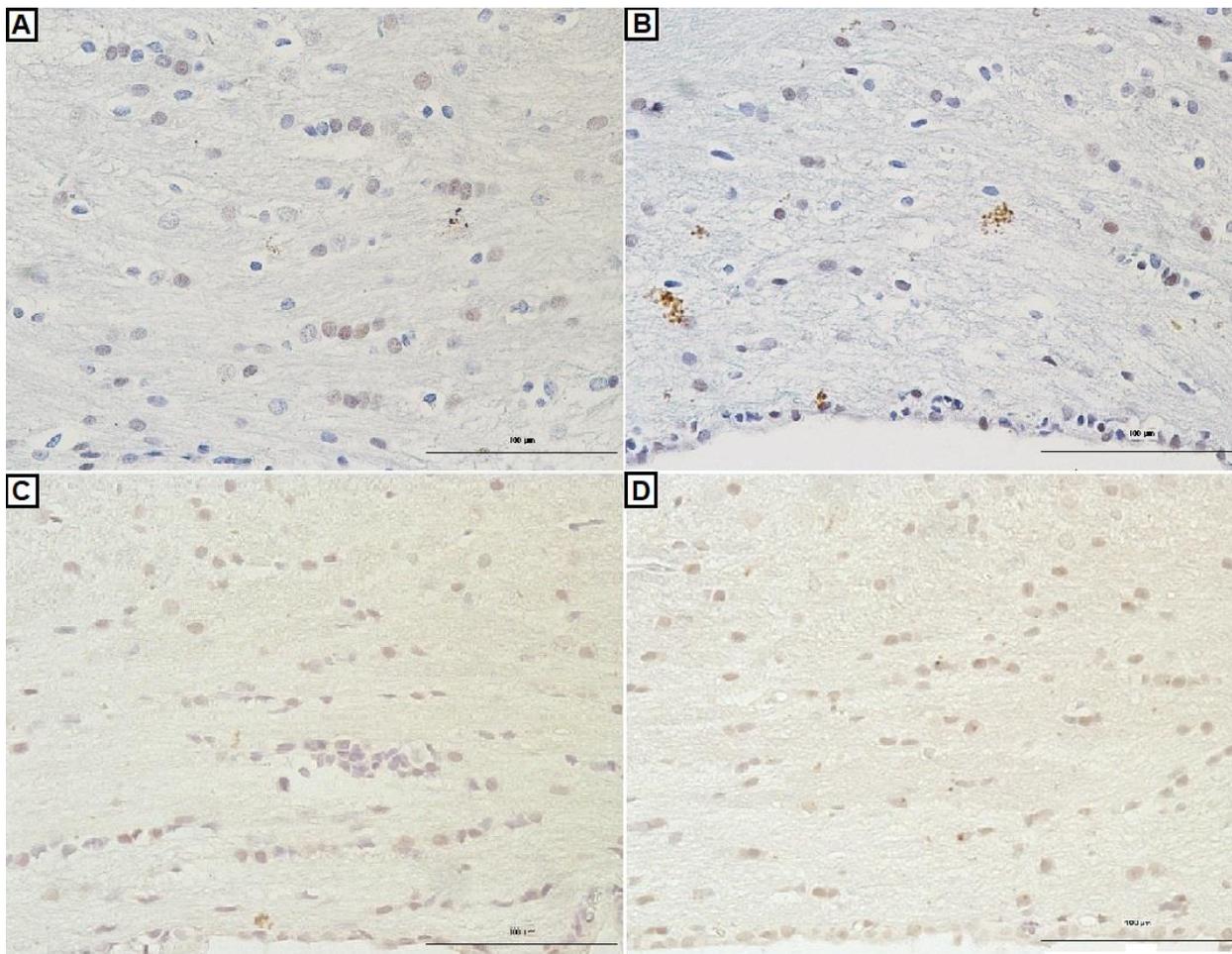


Figura 37 - Fotomicrografias da imunomarcção por COX-2 no corpo caloso. A - grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

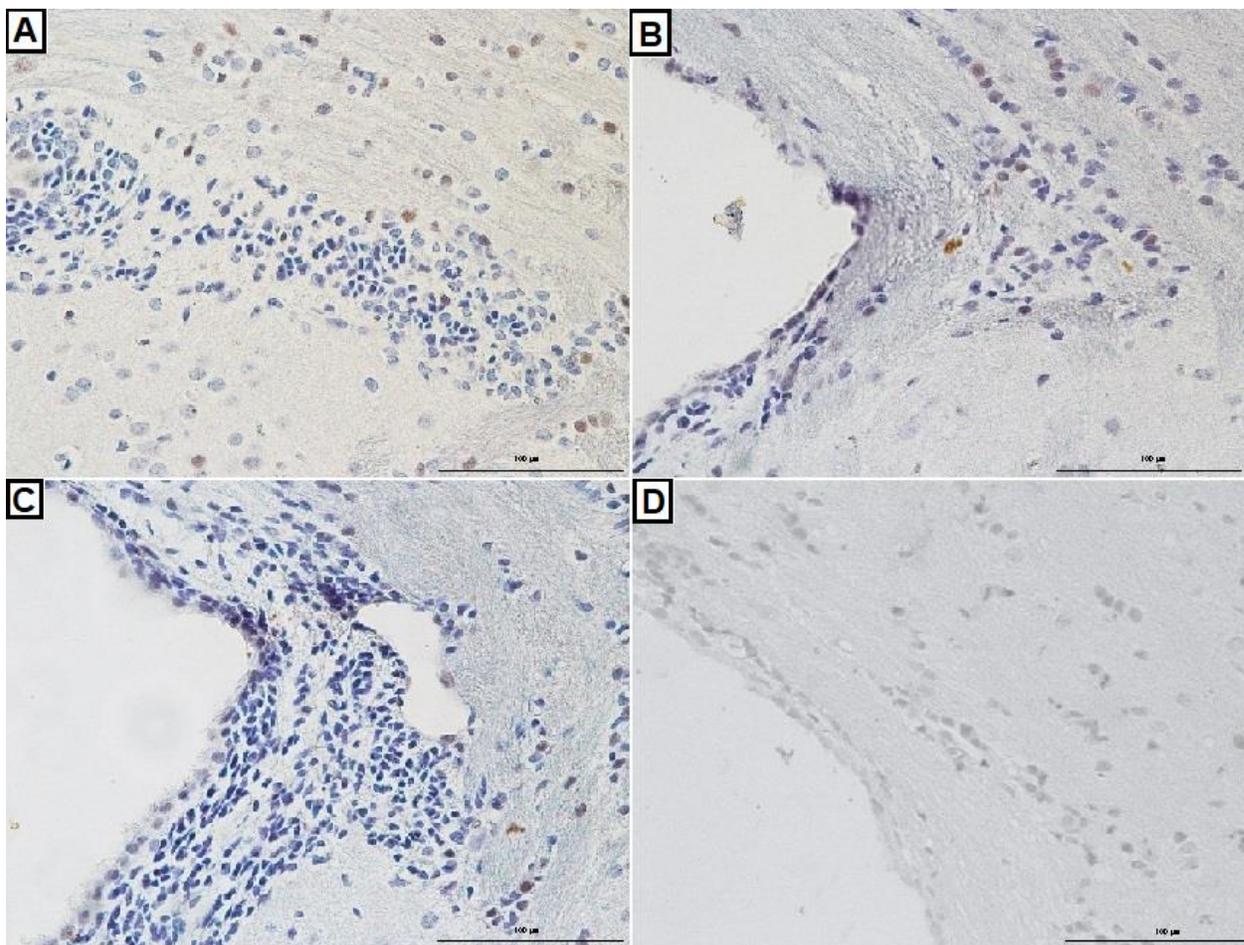


Figura 38 - Fotomicrografias da imunomarcção por COX-2 na matriz germinativa. A - Grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

No córtex cerebral, a imunomarcção por COX-2 foi maior no grupo HTD tanto na região adjacente ao corpo caloso quanto ao hipocampo. O grupo HTOT apresentou a maior variação, demonstrando uma elevada porcentagem de células marcadas no córtex adjacente ao corpo caloso, porém uma baixa porcentagem na região adjacente ao hipocampo (Figuras 39 e 40). Apesar das diferenças qualitativas, a análise estatística não demonstrou significância estatística nos achados.

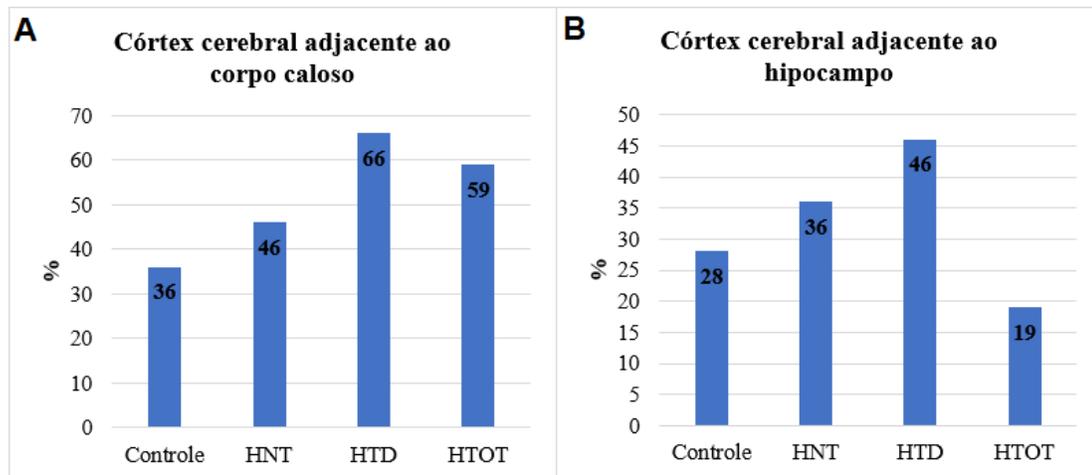


Figura 39 - Gráfico: Análise da porcentagem de células com imunomarcagem para COX-2 no córtex adjacente ao corpo caloso (A) e no córtex adjacente ao hipocampo (B).

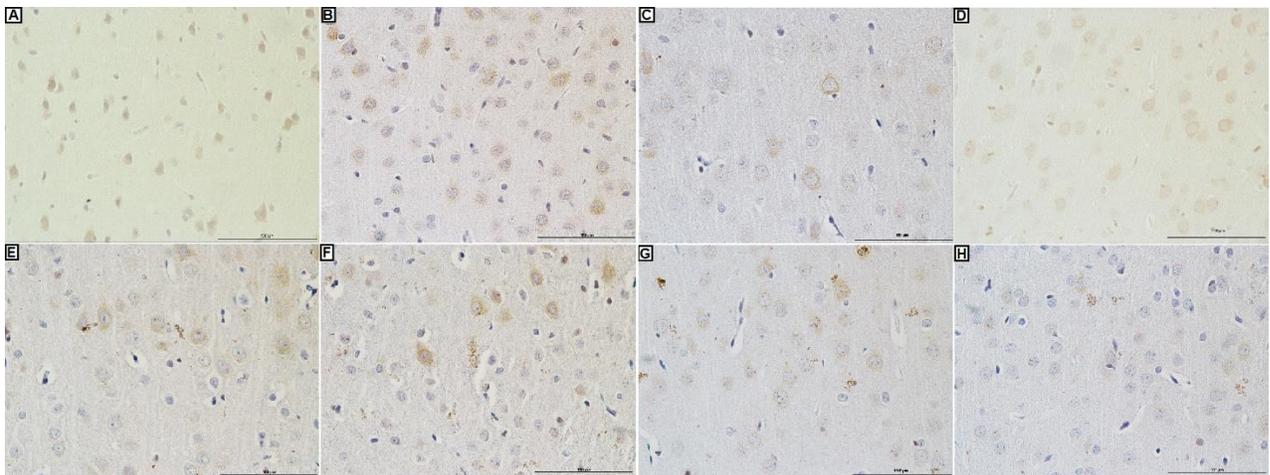


Figura 40 - Fotomicrografias da imunomarcagem por COX-2 no córtex dorsal ao corpo caloso (primeira linha) e no córtex dorsal ao hipocampo (segunda linha). A - Grupo controle; B - hidrocefálico não tratado; C - hidrocefálico tratado e D - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

Na análise das subáreas do hipocampo, o grupo HNT apresentou a maior porcentagem de células com imunomarcagem para COX-2 em todas as regiões analisadas, porém com número bem semelhante aos grupos HTD e HTOT em CA1 e CA2 e aos grupos controle e HTD em CA3 e giro denteado. A maior discrepância na marcação deu-se em CA3 e no giro denteado, tendo o grupo HTOT apresentando porcentagem bem menor de células marcadas em relação aos demais grupos (Figuras 41 e 42). Os achados, entretanto, não tiveram significância estatística.

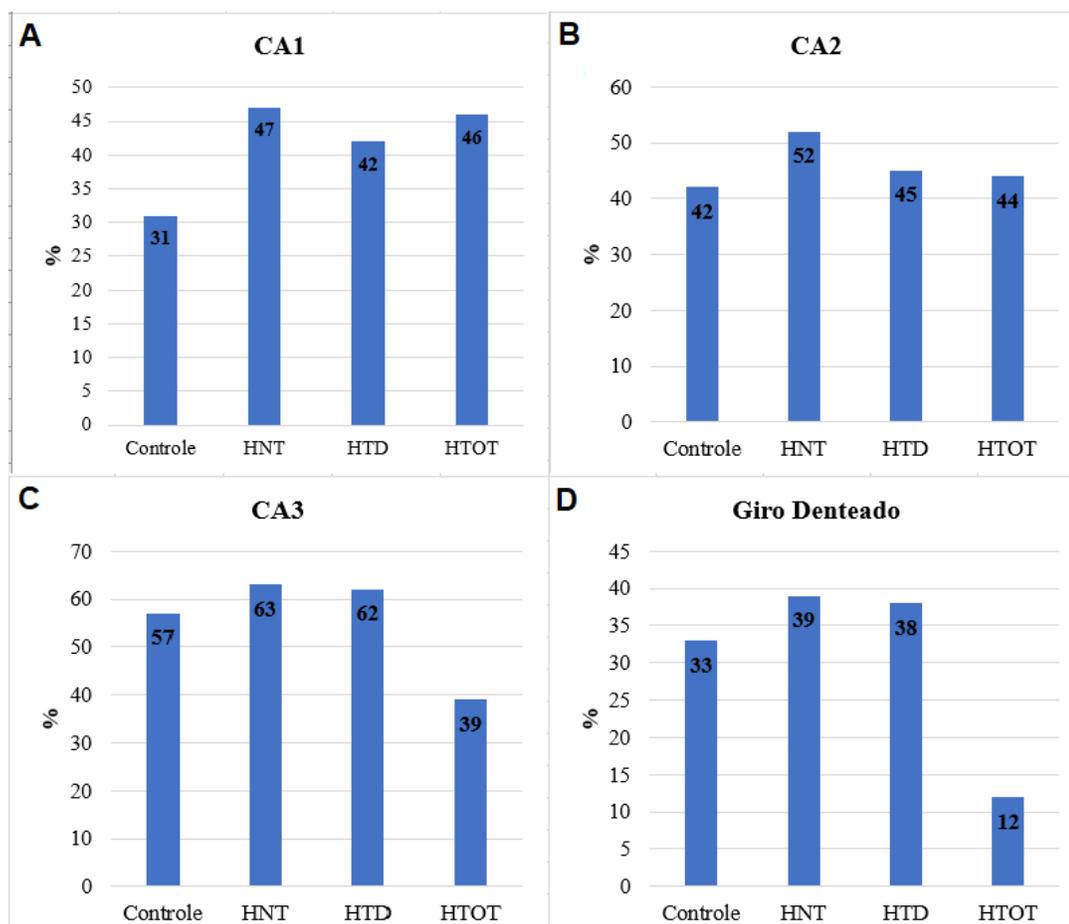


Figura 41 - Gráfico: Análise da porcentagem de células com imunomarcção para COX-2 nas subáreas do hipocampo: A – CA1. B – CA2. C – CA3. D – Giro dentado.

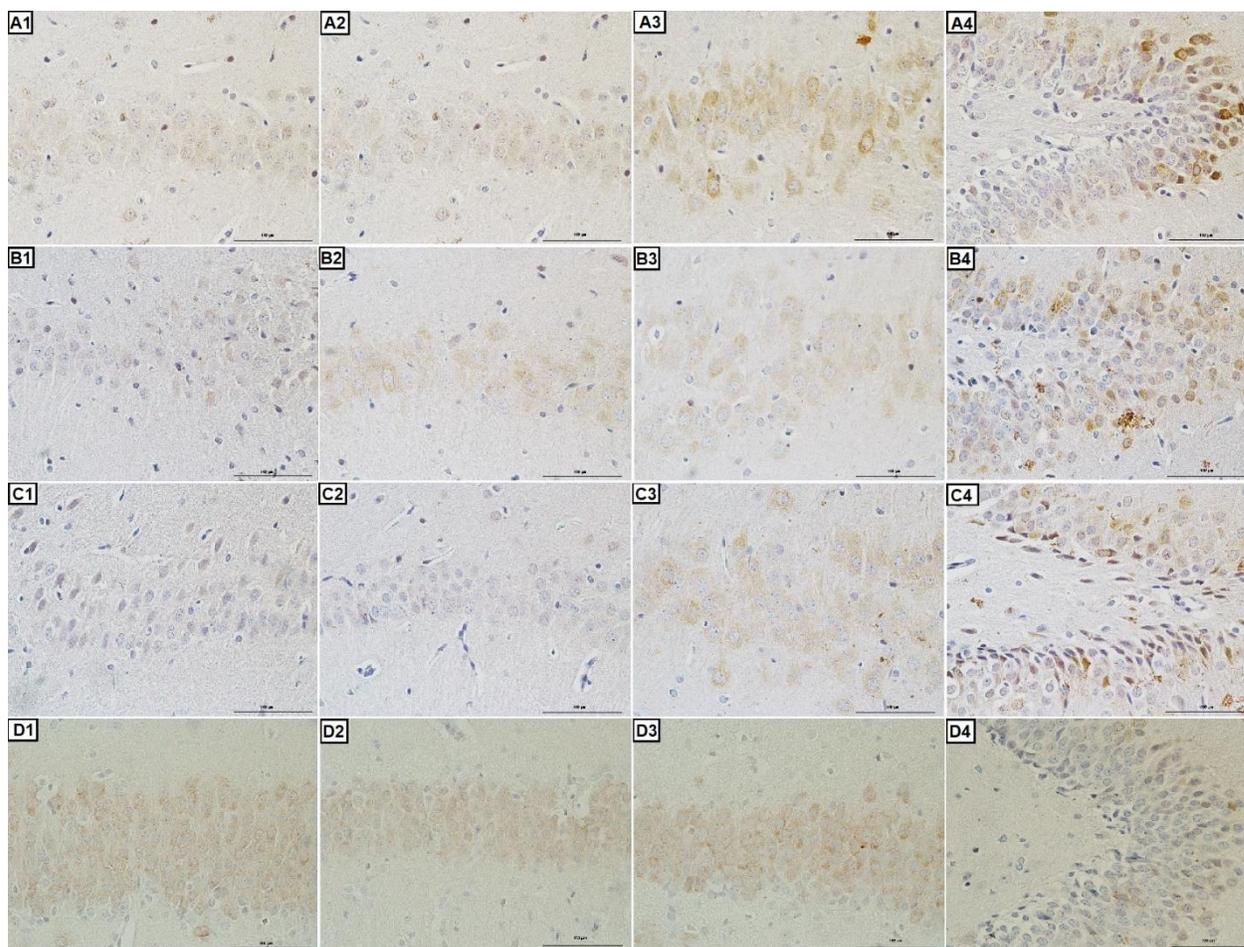


Figura 42 - Fotomicrografias da imunomarcação por COX-2 nas subáreas do hipocampo – CA1, CA2, CA3, e giro denteado, representadas nas colunas, da esquerda para direita. A1, A2, A3, A4 - Grupo controle; B1, B2, B3, B4 - hidrocefálico não tratado; C1, C2, C3, C4 - hidrocefálico tratado e D1, D2, D3, D4 - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnifica o de 40x.

6.4.5 Avalia o imunoistoquímica por Neu-N

Foram analisadas a porcentagem de células com imunomarca o para Neu-N e a densidade de células neuronais. A avalia o qualitativa das lâminas do córtex cerebral adjacente ao corpo caloso evidenciou maior número de células neuronais no grupo HTOT foi maior que nos demais grupos, seguido pelo grupo controle, HNT e HTD, respectivamente (figura 43). Quando analisadas as porcentagens de células marcadas, as diferenças foram menos evidentes, conforme ilustrado no gráfico abaixo (figura 44).

No córtex cerebral adjacente ao hipocampo, a densidade celular também foi maior no grupo HTOT, seguido do grupo controle, HTD e HNT, respectivamente (figura 43). As porcentagens de células com imunomarcagem foram variadas nessa região, tendo o grupo HTD a maior taxa de células neuronais em relação aos demais grupos (figura 44). A figura 45 resume os achados qualitativos nas lâminas dos diferentes grupos.

A análise estatística dos dados mostrou diferença na densidade de células neuronais no córtex adjacente ao corpo caloso ($p=0,03$) entre os grupos HTOT e HNT ($p=0,03$) e HTOT e HTD ($p<0,01$). Não houve diferença na porcentagem de células imunomarcadas. Já no córtex adjacente ao hipocampo, também houve diferença na densidade celular entre os grupos ($p=0,02$) entre os grupos controle e HTOT ($p=0,04$) e HNT e HTOT ($p<0,01$). Não houve diferença significativa entre as porcentagens de células imunomarcadas.

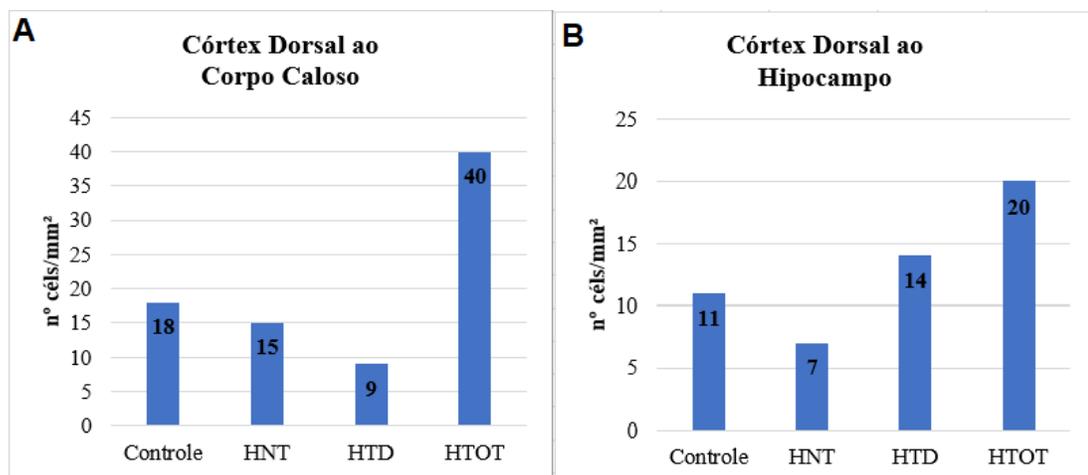


Figura 43 - Gráfico: Análise da densidade celular das células com marcação para Neu-N: A – Média do número de células marcadas por mm^2 no córtex dorsal ao corpo caloso. B – Média do número de células marcadas por mm^2 no córtex dorsal ao hipocampo

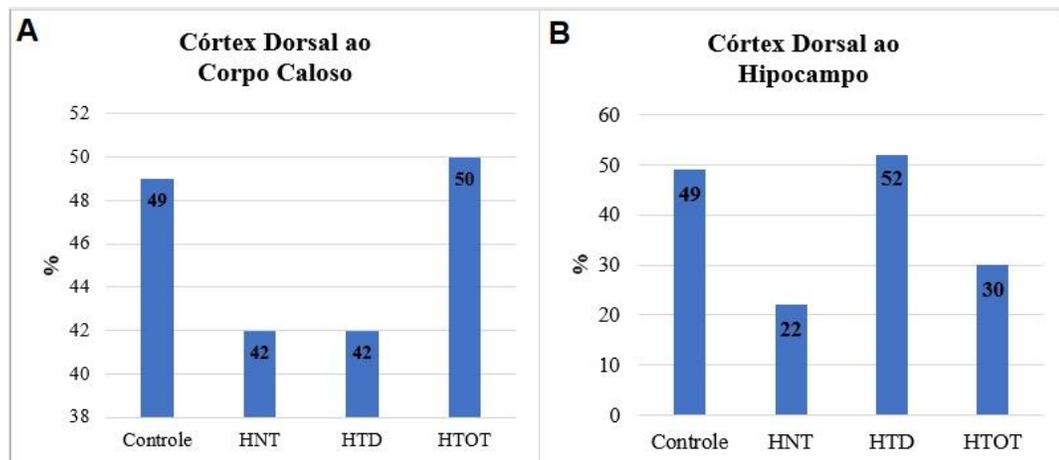


Figura 44 - Gráfico: Análise da porcentagem de células com imunomarcagem para Neu-N nas diferentes regiões do encéfalo: A – Córtex dorsal ao corpo caloso. B – Córtex dorsal ao hipocampo.

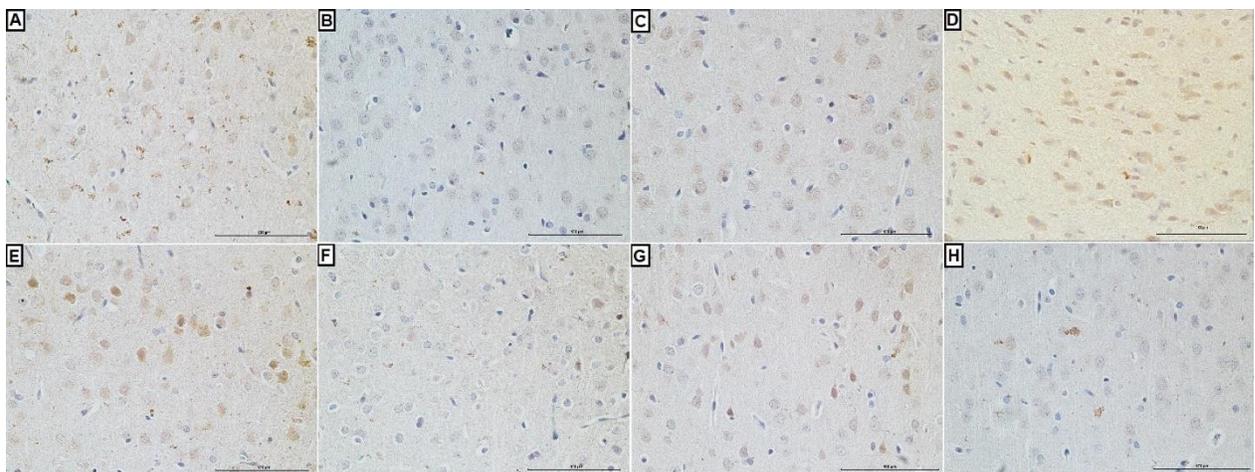


Figura 45 - Fotomicrografias da imunomarcagem por Neu-N no córtex dorsal ao corpo caloso (primeira linha) e no córtex dorsal ao hipocampo (segunda linha). A,E - Grupo controle; B,F - hidrocefálico não tratado; C,G - hidrocefálico tratado e D,H - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

Nas subáreas do hipocampo, a densidade de células neuronais foi maior no grupo HTOT em relação aos demais grupos em todas as regiões avaliadas. O grupo HNT, por sua vez, teve a menor quantidade de células imunomarcadas por mm^2 . A porcentagem variou entre os grupos, nas diferentes áreas. Os achados foram demonstrados nas figuras abaixo (figuras 46, 47 e 48).

A análise estatística dos dados confirmou a diferença na densidade de células neuronais apenas em CA3 ($p=0,02$) entre os grupos HTOT e HNT ($p<0,01$), e grupos controle e HNT

($p=0,02$). Na análise da porcentagem de células imunomarcadas, também houve confirmação estatística da diferença entre os grupos em CA3 ($p=0,03$) entre os grupos HTOT e HNT ($p=0,01$), e grupos controle e HNT ($p<0,01$).

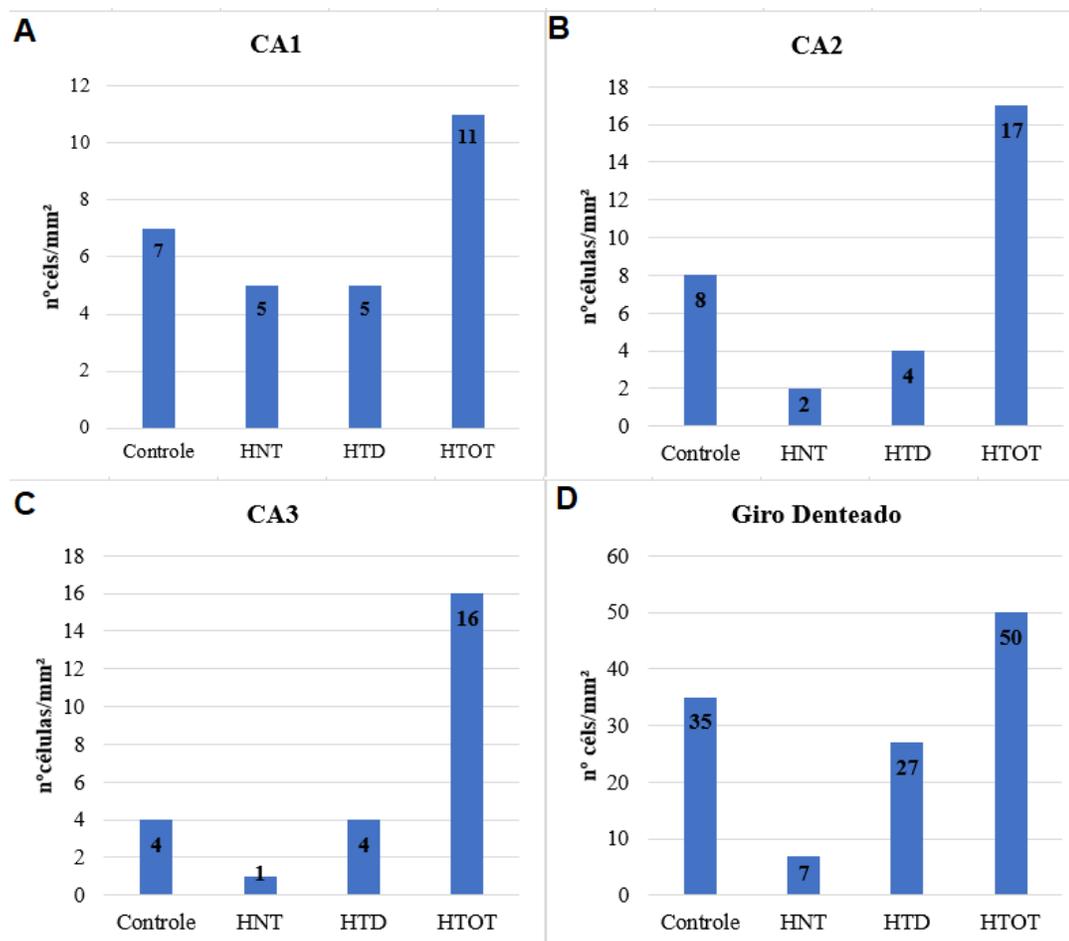


Figura 46 - Gráfico: Análise da densidade celular (média do número de células marcadas por mm²) das células com marcação para Neu-N nas subáreas do hipocampo: A – CA1. B – CA2. C – CA3. D – Giro denteado.

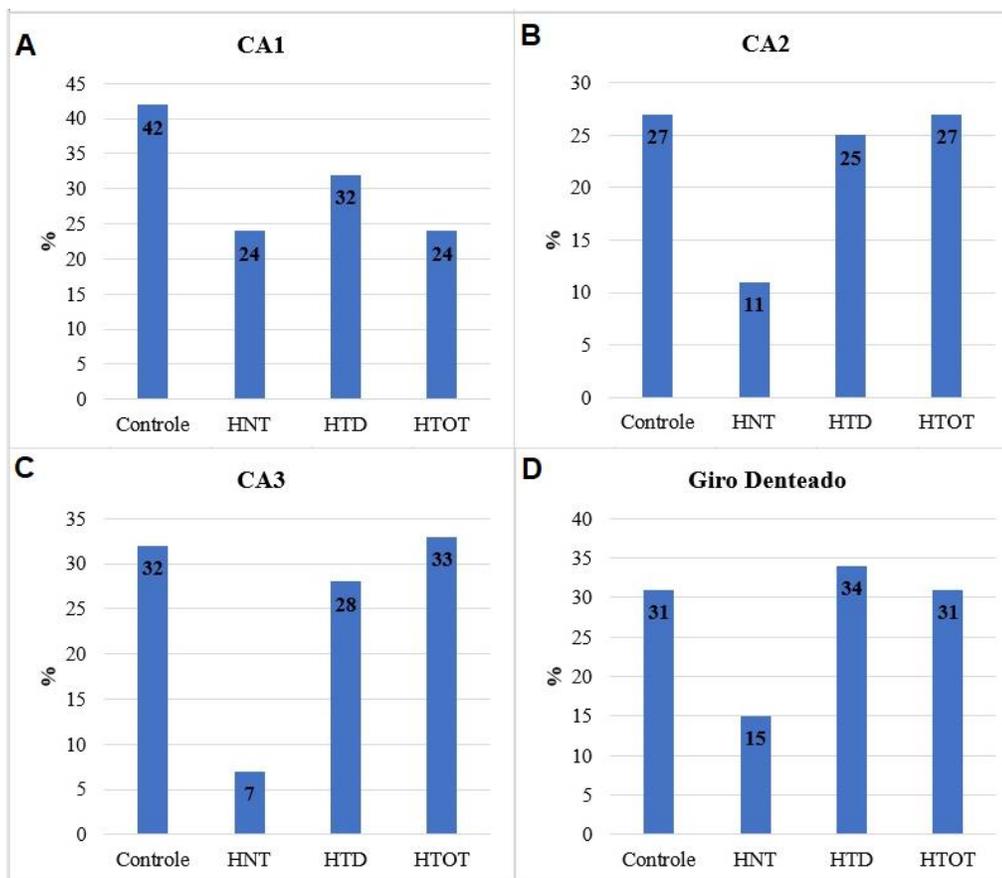


Figura 47 - Gráfico: Análise da porcentagem de células com imunomarcção para Neu-N nas subáreas do hipocampo: A – CA1. B – CA2. C – CA3. D – Giro denteado.

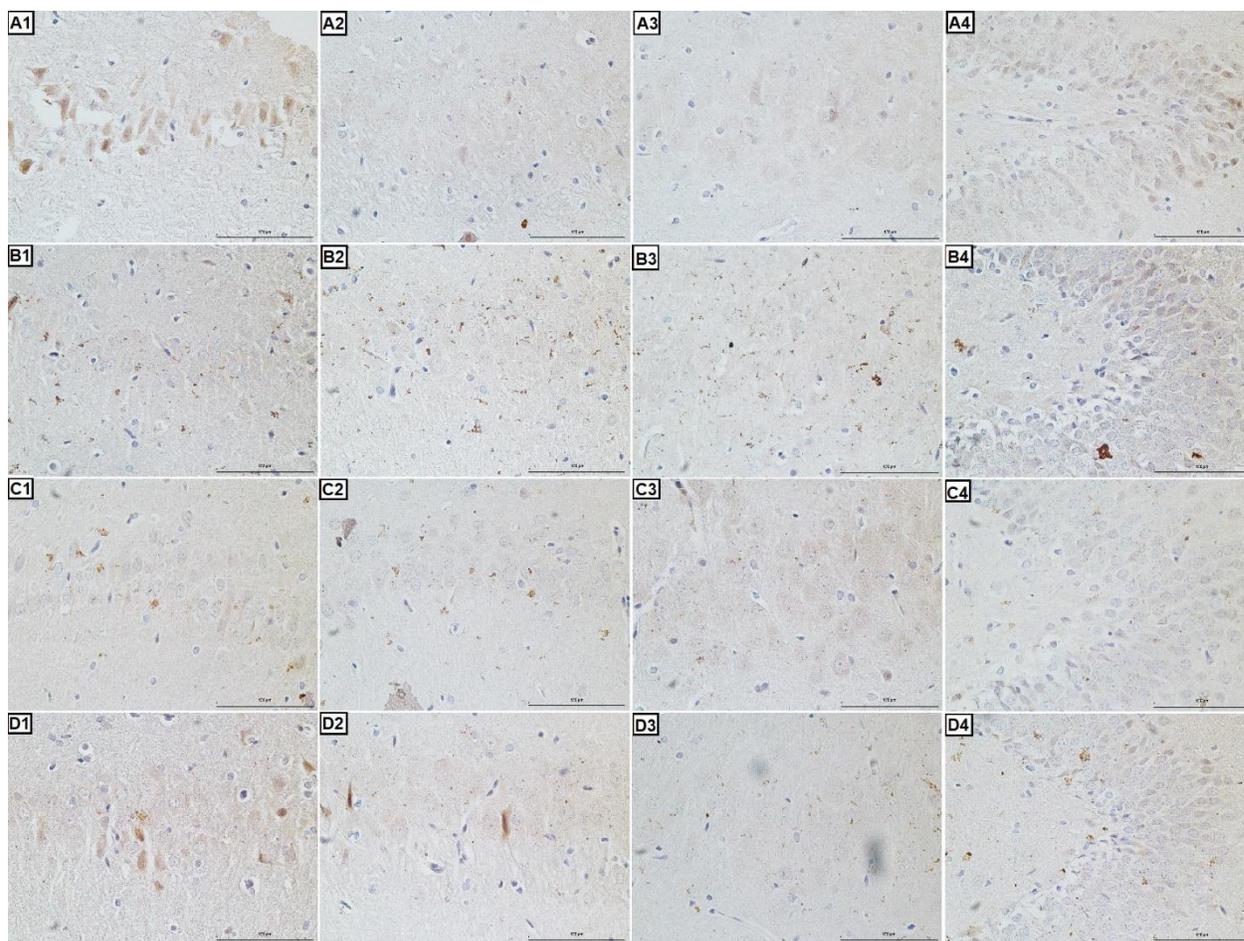


Figura 48 - Fotomicrografias da imunomarcção por Neu-N nas subáreas do hipocampo – CA1, CA2, CA3 e GD, representados nas colunas, respectivamente, da esquerda para a direita. A1, A2, A3, A4 - Grupo controle; B1, B2, B3, B4 - hidrocefálico não tratado; C1, C2, C3, C4 - hidrocefálico tratado e D1, D2, D3, D4 - hidrocefálico tratado com shunt obstruído. Magnificação de 40x.

7 Discussão

A hidrocefalia é uma doença multifatorial cujos mecanismos fisiopatológicos ainda não são totalmente conhecidos. Sabe-se que existem mecanismos primários ou causais e lesões secundárias à ventriculomegalia, com efeitos deletérios no cérebro de diferentes gravidades e nem sempre reversíveis, a depender da magnitude, da velocidade de instalação e da duração da ventriculomegalia.

As alterações histopatológicas cerebrais secundárias à hidrocefalia ocorrem pela combinação da atuação de fatores mecânicos (dano direto pelo estiramento das fibras), redução do fluxo sanguíneo e acúmulo de metabólitos tóxicos no liquor (DEL BIGIO *et al.*, 2003). Quando ocorre em estados mais tardios da maturação cerebral, a hidrocefalia pode ainda retardar o processo de mielinização. A doença resulta em déficits no equilíbrio, postura, marcha, habilidades manuais, além de déficits de aprendizagem e memória. (DEL BIGIO, 2010).

Diversos estudos em animais sugerem que o tratamento da hidrocefalia pode reverter parcialmente os danos causados pela doença. (DEL BIGIO, 1993, 1994, 1997; CHUMAS *et al.*, 1994). Estudos realizados em seres humanos e animais mostraram que os déficits de aprendizagem e memória podem ser revertidos após o tratamento da hidrocefalia (BARF *et al.*, 2003; CHAUDRY *et al.*, 2007; DEL BIGIO, 2010).

Apesar dos avanços das técnicas neurocirúrgicas endoscópicas, o tratamento da hidrocefalia ainda se apoia majoritariamente na realização das derivações ou *shunts*.

Dados da literatura mundial demonstram que as taxas de mau funcionamento dos *shunts* podem chegar a 30-40% ao longo do primeiro ano de tratamento e superar 50% no segundo ano, contribuindo sobremaneira para a alta morbidade relacionada à hidrocefalia. Somado a essa elevada taxa de falha, a ventriculomegalia que se desenvolve em cérebros imaturos de fetos e neonatos pode resultar em lesões celulares irreversíveis. (MCALLISTER, 2012; HANAK *et al.*, 2017).

Apesar da elevada incidência de mau funcionamento dos *shunts*, os efeitos histopatológicos e clínicos que a recorrência da hidrocefalia pode acarretar são desconhecidos. Dados da literatura acerca do tema são escassos, não existindo até o momento modelo experimental reportado cujo enfoque seja a disfunção do sistema de derivação.

O presente trabalho tem como objetivo principal analisar as alterações clínicas e histopatológicas causadas pela recorrência da hidrocefalia secundárias a disfunção de um *shunt*. Para este fim foi utilizado modelo experimental de indução e tratamento de hidrocefalia em ratos recém-nascidos já utilizado neste laboratório de pesquisa: a hidrocefalia foi induzida pela injeção intra-cisternal de caulim em animais com 7 dias de vida; posteriormente, esses animais foram submetidos a derivação ventriculocutânea (DVSC) para tratamento da doença (SANTOS, 2016). Para obstrução e desobstrução do *shunt*, foi desenvolvido novo modelo com intuito de simular uma disfunção de derivação, com posterior tratamento e resolução do quadro.

O ganho ponderal dos animais é um dado clínico relevante ao se considerar a progressão da doença e o grau de desidratação dos animais. Sabe-se que animais hidrocefálicos tem menor ganho de peso em comparação a animais controle (DEL BIGIO *et al.*, 2003; DI CURZIO *et al.*, 2014; WILLIAMS *et al.*, 2014).

Estudo realizado por Khan *et al.* (2006) demonstrou que a redução da taxa de ganho de peso em ratos é um bom preditor da gravidade da hidrocefalia. A análise comparativa do ganho ponderal em 36 ratos com hidrocefalia induzida por caulim com relação a animais controles evidenciou que àqueles com ventriculomegalia grave apresentavam redução do ganho de peso no 19º dia após a injeção.

Catalão *et al.* (2014) compararam o ganho de peso de 37 animais divididos entre grupos de ratos controle, hidrocefálicos sem tratamento e hidrocefálicos tratados com derivação ventrículo subcutânea, funcionante ou não. Neste estudo, animais controle e hidrocefálicos sem tratamento apresentaram maior ganho de peso em relação ao grupo tratado com derivação, sendo significativa a diferença no 8º dia após a indução. Ratos controle tiveram maior ganho de peso em relação aos animais não tratados (sem relevância estatística).

No presente estudo, não houve diferença significativa entre as médias de peso nos diferentes grupos animais no P0 (dia da indução da hidrocefalia). Em concordância com os dados da literatura, a análise da progressão do peso evidenciou que os animais do grupo controle apresentaram não apenas a maior média de peso ao final do experimento, mas também a maior taxa de ganho de peso, porém sem significância estatística em comparação com os grupos HT e HNT. O grupo HTOT, por sua vez, teve a menor média final de peso e a menor taxa de ganho ponderal em comparação a todos os demais grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os ganhos de peso nos demais grupos. O menor ganho de peso do grupo HTOT poderia estar hipoteticamente relacionado ao estresse

relacionado à cirurgia e/ou à anestesia para realização da Ultrassonografia, e não necessariamente à hidrocefalia.

Para análise do comportamento e desenvolvimento sensório-motor foi utilizado o teste do *Open Field*. Este teste é amplamente utilizado em modelos experimentais de doenças neuromusculares pois são de fácil execução e não invasivos, podendo então ser repetidos em várias etapas do procedimento (TATEM *et al.*, 2014). Através dele pode ser avaliada a capacidade deambulatória de cada animal e como ocorre seu desenvolvimento, bem como as alterações acarretadas pela doença (no caso a instalação da hidrocefalia) e pelos tratamentos implementados (DVSC, obstrução e desobstrução do mesmo).

Outros testes para avaliação motora são descritos na literatura. Os testes do cilindro rotatório, a barra horizontal, barra estática ou as barras paralelas podem ser utilizados para avaliação da coordenação motora em ratos e exigem força e habilidade motora para sua execução (DEACON, 2013). Estes testes são de difícil aplicação no modelo deste estudo devido à limitação relacionada ao tamanho e idade dos animais.

Alterações clínicas secundárias à hidrocefalia foram descritas. Ratos hidrocefálicos apresentam alteração do formato cefálico (cabeça em formato de domo), dorso com curvatura cifótica, marcha com base alargada e/ou lentificada (KHAN *et al.*, 2006). Essas alterações foram identificadas nos animais hidrocefálicos do presente estudo.

No presente trabalho, os animais foram submetidos a 8 avaliações em dias alternados no Open Field, de P6 a P20. Foram avaliados os tempos de permanência nas bordas, de permanência no centro, de exploração vertical e de auto-limpeza, além das características da marcha. Para efeitos de comparação entre os grupos, foram considerados três períodos específicos, P6, P16 e P20, que correspondem respectivamente ao dia anterior a realização da DVSC nos grupos cirúrgicos, ao 3º dia após obstrução da DVSC no grupo HTOT e ao 3º dia pós desobstrução do sistema nesse mesmo grupo. A escolha desses períodos para realização das análises comparativas teve como objetivo minimizar os possíveis efeitos que o estresse cirúrgico/anestésico pudesse causar, afetando então os resultados obtidos.

O grupo HTOT teve o maior tempo de permanência nas bordas em relação aos demais grupos, sendo esta diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos controle e HT em P20 e P16, respectivamente. A análise do tempo de permanência no centro teve resultado inverso, conforme esperado (a permanência no centro e nas bordas são eventos mutuamente

exclusivos). O maior tempo de permanência no centro reflete uma maior tendência de exploração do ambiente pelo animal, porém não deve ser considerado isoladamente. O tempo de permanência nas bordas foi considerado não apenas com o animal parado, mas também quando o animal estava em movimento pelas bordas da arena. Portanto, a análise do tempo nas bordas deve ser considerada em conjunto com a avaliação da marcha.

A característica e evolução da marcha ocorreu de maneira semelhante entre os animais até P14: de P6 a P10, todos os grupos apresentavam dificuldade na marcha, com curvatura dorsal cifótica, base alargada e instabilidade na deambulação; de P12 a P14, também não se observou diferenças entre os grupos, em que todos apresentavam marcha normal, porém com discreta letargia ou redução da atividade. A partir de P16 observou-se diferença entre os grupos: o grupo HNT não apresentou evolução da marcha a partir desse período; o grupo controle atingiu a marcha normal já em P16; os grupos HT e HTOT atingiram a marcha normal a partir de P18 e P20, respectivamente.

Di Curzio *et al.* (2013) comparou o comportamento de furões saudáveis e com hidrocefalia no teste do campo aberto. Em seu estudo, durante a primeira semana de teste, ambos os grupos demonstraram performance semelhante, com pouca movimentação e comportamento exploratório quando colocados na arena. Com a progressão do estudo, os animais hidrocefálicos tornaram-se erráticos, com tendência a andar em direção às bordas da arena. Os achados são semelhantes aos encontrados no presente estudo. Os grupos submetidos a tratamento, com ou sem obstrução do sistema, tiveram aparente recuperação da capacidade de marcha.

É bem estabelecido na literatura que a ventriculomegalia tem efeitos negativos evidentes na marcha e desenvolvimento motor em ratos hidrocefálicos em relação a animais controle (DEL BIGIO;ZHANG, 1998; CATALÃO *et al.*, 2014; ESKANDARI *et al.*, 2012). Entretanto, existem divergências entre os estudos no que concerne ao período de maior susceptibilidade aos efeitos negativos da ventriculomegalia e do quanto esses efeitos prejudicam o desempenho motor dos animais nos testes realizados. Khan *et al.* (2006) demonstraram que, apesar das alterações qualitativas na marcha de ratos hidrocefálicos, seu desempenho no teste do cilindro rotatório não foi prejudicado. Del Bigio *et al.* (2003), durante testes de função motora, encontraram que ratos hidrocefálicos apresentavam desempenho inferior aos controles apenas na fase tardia do experimento (8º mês de vida).

Catalão *et al.* (2014), ao compararem os resultados do teste do *Open Field* de animais hidrocefálicos e controle a grupos submetidos a tratamento cirúrgico da hidrocefalia com a

derivação ventrículo-subcutânea, encontraram que 2 dias após o procedimento os animais com shunt apresentavam escore comparável ao de animais não tratados. Entretanto, de 4 a 6 dias após o tratamento, seus escores se assemelhavam àqueles do grupo controle. Eskandari *et al.*(2012), por sua vez, submeteram animais hidrocefálicos a tratamento da ventriculomegalia com punções ventriculares intermitentes. Neste estudo, o desempenho dos animais tratados no teste de função motora não foi superior ao grupo hidrocefálico não tratado.

No presente estudo, apesar da subjetividade da avaliação, os achados demonstraram que o grupo HT foi o que mais se aproximou do grupo controle. O grupo HTOT, devido a descompensação da hidrocefalia (período em que ocorreu a obstrução do sistema), teve o desenvolvimento motor prejudicado em comparação com o grupo HT.

A maior diferença entre os grupos ocorreu na avaliação comparativa do tempo em exploração vertical: o grupo HTOT apresentou menor tempo em comparação com os demais, sendo esta diferença estatisticamente significativa em P16 e P20. O grupo HNT, diferentemente do esperado, não teve redução do tempo de exploração vertical em comparação aos grupos controle e HT. Esses achados podem refletir que apesar de o tratamento da hidrocefalia pela desobstrução da DVSC permitir um desenvolvimento normal da marcha, ainda persiste instabilidade e/ou ataxia nesses animais a ponto de prejudicarem a exploração vertical.

A avaliação comparativa da autolimpeza, de modo geral, não demonstrou diferenças estatísticas entre os grupos, tendo como exceção a comparação entre o grupo controle e HT no P20 do estudo. Esses dados revelam que a presença ou ausência, bem como o grau de hidrocefalia dos animais pouco interferiram na sua capacidade de higiene.

Sabe-se que a hidrocefalia está associada a atrofia das fibras axonais que conectam o hipocampo ao restante do encéfalo, resultado em alterações à nível de neurotransmissores que justificam os déficits de memória em humanos e animais (EGAWA *et al.*, 2002; DEL BIGIO *et al.*, 2003; DEL BIGIO, 2004).

Para análise da memória e aprendizado espacial foi utilizado o teste do labirinto aquático de Morris (MORRIS, 1984). Seu uso é bem estabelecido na literatura por ser de fácil aplicação sem necessidade de treinamento prévio, sua confiabilidade em diferentes tipos de tanque e protocolos, sua aplicabilidade em diferentes espécies animais e a evidência de sua validade como avaliação de memória espacial e referencial dependente do hipocampo. (VOORHES; WILLIAMS, 2006).

O teste foi realizado no 14º e 15º dias (P14 e P15) após a indução da hidrocefalia para todos os grupos. O grupo HTOT, excepcionalmente, foi avaliado novamente no 19º e 20º (P19 e P20) dias pós indução da hidrocefalia. O objetivo foi determinar o impacto da descompensação temporária da hidrocefalia nesses animais.

Khan *et al.* (2006) demonstraram que animais com hidrocefalia grave apresentam déficit de memória, visto que esses animais não tiveram melhora da sua habilidade de encontrar a plataforma em testes sucessivos realizados no mesmo dia, quando em comparação com animais controle. Acredita-se que esse déficit seja relacionado a destruição das conexões da fímbria e do fórnix em detrimento de uma lesão direta ao hipocampo (DEL BIGIO *et al.*, 2003).

Apesar do prejuízo da memória, animais hidrocefálicos ainda possuem capacidade de aprendizado. Williams *et al.* (2014) compararam 28 ratos com hidrocefalia induzida por caulim a animais controle; os resultados mostraram que os animais hidrocefálicos têm velocidade de natação semelhante aos controles, apesar de apresentarem maior tempo de chegada a plataforma, sendo a piora do desempenho inversamente proporcional à gravidade da hidrocefalia.

No presente estudo, quando considerados os desempenhos dentro do mesmo grupo, os resultados foram variados: o grupo controle mostrou redução estatisticamente significativa do tempo de chegada a plataforma quando comparados os desempenhos nos períodos vespertinos do primeiro e segundo dias (T1 e T2). O grupo HNT teve melhora do desempenho entre o primeiro dia de teste (M1 e T1) em comparação à manhã do segundo dia (M2).

O grupo cirúrgico HT não teve redução significativa dos tempos de chegada. O grupo HTOT na primeira avaliação (HTOT1) tiveram melhora da performance ao se comparar a manhã do primeiro dia (M1) com todos os demais períodos (T1, M2 e T2). Já em sua segunda avaliação, o grupo HTOT (HTOT2) apresentou melhora do desempenho da memória entre M1 e todos os demais períodos (T1, M2 e T2), bem como entre os períodos vespertinos (T1 e T2).

Na análise comparativa entre grupos, o grupo HTOT, durante sua primeira avaliação, apresentou o maior tempo de chegada entre os demais animais estudados, sendo a diferença estatisticamente significativa em todos os períodos quando comparado a todos os demais grupos. Não houve diferença entre o desempenho do grupo HT com relação aos grupos dos animais controle e com hidrocefalia não tratada. Esses resultados também foram encontrados no estudo realizado por Catalão *et al.* (2014), em que não se observou diferença entre o desempenho dos animais hidrocefálicos tratados e não tratados.

Após a desobstrução do sistema no grupo HTOT, observou-se redução do tempo de chegada em comparação a primeira avaliação em todos os períodos considerados, sendo a diferença estatisticamente significativa apenas nos períodos matutino e vespertino do segundo dia.

Apesar da melhora do desempenho do grupo HTOT entre a primeira e segunda avaliações, ainda houve diferença significativa entre os tempos de chegada deste grupo em relação aos demais grupos. O grupo HTOT teve menor tempo de chegada a plataforma em comparação aos grupos HNT e HT no último período (T2), porém sem relevância estatística. Esses achados mostram que apesar da melhora do desempenho após o tratamento da recidiva da hidrocefalia, o prejuízo na memória espacial foi irreversível no período estudado: o desempenho do grupo HTOT foi inferior aos demais grupos apesar do tratamento instituído e apesar da maior idade cronológica deste grupo na ocasião da comparação (animais do grupo HTOT estavam com 26 e 27 dias de vida em sua segunda avaliação).

O estudo histológico das amostras com a coloração de hematoxilina-eosina permitiu a análise da citoarquitetura cerebral em duas regiões periventriculares (corpo caloso e matriz germinativa) e no córtex cerebral adjacente ao corpo caloso.

A comparação entre as lâminas dos animais dos diferentes grupos revelou que os animais controle, conforme esperado, apresentam epêndima íntegro, corpo caloso espesso, sem estiramento entre as fibras. O grupo HNT apresenta corpo caloso afilado, com edema entre as fibras, epêndima com células achatadas e com evidente descontinuidade em seu epitélio. Os grupos HT e HTOT, apresentaram discreto afilamento do corpo caloso e edema entre suas fibras, porém com células endimárias mais regulares e menos achatadas.

Os resultados encontrados no presente estudo estão em concordância com os achados demonstrados em diversas análises histológicas sobre hidrocefalia experimental encontradas na literatura: ratos jovens hidrocefálicos apresentam corpo caloso afilado, com perda da integridade endimária, além de estiramento e rarefação das fibras da substância branca periventricular (DEL BIGIO *et al*, 1993; DEL BIGIO;ZHANG, 1998; DEL BIGIO *et al*, 2003; DEL BIGIO, 2004; DI CURZIO *et al*, 2013; KHAN *et al*, 2006; LOPES *et al*, 2009).

Através do estudo histológico com luxol *fast-blue*, corante utilizado para marcação da mielina nos tecidos neurais, foi possível análise mais detalhada do corpo caloso. Como esperado e já demonstrado pelo estudo com hematoxilina-eosina, o grupo controle obteve a maior média de espessura do corpo caloso em comparação aos demais grupos, sendo essa diferença corroborada

pela análise estatística. Além disso, o grupo hidrocefálico não tratado apresentou menor espessura do corpo caloso em relação aos grupos submetidos a tratamento, com ou sem obstrução. Esses achados demonstram que o tratamento cirúrgico, se instituído em tempo hábil, é capaz de reverter parcialmente o acometimento da substância branca periventricular. A intensidade da marcação foi menor no grupo hidrocefálico não tratado, porém a diferença não teve comprovação estatística.

A matriz germinativa consiste em região do cérebro localizada lateralmente ao ventrículo lateral, sendo composta por grande quantidade de células precursoras neuronais e gliais e uma rica rede vascular. Em seres humanos, o volume da matriz diminui substancialmente após a 24ª semana de gestação, praticamente desaparecendo na 36ª-37ª semanas de gestação (DI ROCCO *et al*, 2020).

A análise das lâminas da matriz germinativa do grupo controle mostrou grande densidade celular nessa região, além da presença de núcleos bem arredondados e epêndima íntegro. Nos grupos HNT e HTOT, por sua vez, pode-se observar redução importante da densidade celular nessa região, além da presença de edema entre as fibras e perda de continuidade endimária, particularmente no grupo HNT. O grupo HT demonstra achados intermediários entre os grupos: o epêndima apresenta-se íntegro, com discreto edema entre as fibras, porém com densidade celular mais próxima dos animais controle. Esses achados mostram que o tratamento precoce e duradouro da hidrocefalia, como no caso do grupo HT, permite melhor preservação da integridade da matriz germinativa.

Esses achados já foram demonstrados em outros trabalhos encontrados na literatura médica. Estudos observacionais realizados em materiais provenientes de autópsia humana e, principalmente, em ratos da linhagem H-Tx sugerem que a hidrocefalia congênita pode prejudicar a proliferação e subsequente migração celular a partir da região da matriz germinativa (KHAJED *et al.*, 2002; NOJIMA *et al.*, 1998; OWEN-LYNCH *et al.*, 2003).

Apesar das diferenças observadas na citoarquitetura das regiões periventriculares entre os diferentes grupos, observou-se que no córtex dos animais estudados as discrepâncias foram menos evidentes. Estudo realizado por Del Bigio *et al.* (2003) caracterizou os achados histológicos em 15 animais com hidrocefalia induzida por caulim e demonstrou que, apesar da gravidade do dano axonal periventricular, as alterações corticais só eram evidentes se houvesse erosão completa da substância branca. No presente estudo, observou-se redução da espessura do córtex cerebral em animais com hidrocefalia não tratada quando em comparação com o córtex dos animais controle. Como esperado, os animais submetidos ao tratamento com derivação (obstruída ou não)

apresentaram achados intermediários. Apesar da notável diferença na espessura cortical entre os grupos, pode-se observar que houve preservação da arquitetura cortical, mesmo em animais com hidrocefalia grave.

Os achados do nosso trabalho corroboram os resultados encontrados em diversos estudos realizados até o momento. Aoyama *et al.* (1992) analisou a citoarquitetura cortical em cães hidrocefálicos sem tratamento (considerado grupo pré shunt) e após realização de derivação ventricular (grupo pós shunt). Seus resultados demonstraram uma importante redução do manto cerebral nos animais com hidrocefalia não tratada, porém com manutenção da arquitetura neuronal cortical. Após o tratamento, a reconstituição do manto cortical se deu às custas do aumento do volume da substância branca associada a proliferação astrogliar e regeneração da bainha de mielina. Esses achados também foram demonstrados pelos estudos realizados por Friede *et al* (1966), Del Bigio e Zhang (1988) e Catalão *et al* (2014).

A análise qualitativa da estrutura do hipocampo pela coloração por hematoxilina-eosina não mostrou diferenças significativas entre os grupos, achado já demonstrado por Lopes *et al.* (2009).

Através estudo imunistoquímico por GFAP realizou-se a análise quantitativa e qualitativa da reação astrocitária nas duas regiões periventriculares anteriormente descritas.

No estudo das lâminas do corpo caloso, o grupo HTOT apresentou reação astrocitária mais intensa com relação aos demais grupos: além da maior densidade astrocitária, as células eram intensamente marcadas, com prolongamentos grosseiros e irregulares. As lâminas de todos os demais grupos evidenciaram astrócitos reativos, porém com menor densidade. No grupo controle, os astrócitos apresentam prolongamentos finos e pouco visíveis. A densidade e intensidade da marcação astrocitária nos grupos HNT e HT foram parecidas, apesar das diferenças na citoarquitetura evidenciada pelos estudos com Hematoxilina-eosina anteriormente descritas.

Apesar da não comprovação estatística das diferenças encontradas na análise qualitativa do corpo caloso entre os diferentes grupos, os achados no presente estudo corroboram resultados já relatados na literatura médica. Experimentos realizados em ratos com hidrocefalia induzida por caulim evidenciaram presença de astrócitos reativos hipertróficos na substância branca periventricular (DEL BIGIO; ZHANG., 1998; DEL BIGIO *et al.*, 2003; DI CURZIO *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2009), sendo maior a quantidade e a intensidade da reação astrocitária de acordo com a magnitude da dilatação ventricular (DEL BIGIO *et al.*, 2003). Animais

controle apresentam células astrocíticas esparsas na substância branca, com prolongamentos pouco visíveis (DEL BIGIO; ZHANG., 1998).

No presente estudo, a densidade astrocítica e a intensidade da reação foram maiores nos grupos cirúrgicos, mesmo em comparação com o grupo hidrocefálico não tratado. Pode-se considerar como possível causa para esse achado a reação inflamatória em resposta ao trauma cirúrgico e presença do cateter ventricular. Além disso, sabe-se que a reconstituição da substância branca periventricular ocorre também às custas da proliferação astrocítica, resultando no aumento da imunoreação para o GFAP. O papel da reação astrocítica após o tratamento é incerto: a proliferação astrogliosa pode interferir negativamente na regeneração axonal. Entretanto, estudo realizado por Aoyama *et al* (2006) mostrou que os astrócitos reativos expressam fatores neurotróficos com papel protetor na regeneração de neurônios. Além disso, observou-se que a reação astrocítica tornou-se mais intensa após o tratamento da hidrocefalia e tornava-se menos evidente em fases mais tardias, no grupo sem tratamento. No presente estudo ficou evidente a intensa reação astrocítica no grupo HTOT, podendo essa discrepância ser explicada tanto pela recorrência da hidrocefalia quanto pelas múltiplas abordagens cirúrgicas.

Miller e McAllister II (2007) avaliaram a imunomarcagem por GFAP em ratos H-Tx submetidos a tratamento com derivação em diferentes períodos. Os animais eram submetidos a derivação aos 15 dias de vida; observaram que após o tratamento com derivação houve redução do número de células marcadas com GFAP, sugerindo que o tratamento da hidrocefalia permite melhora da astrocitose reativa. Notaram, entretanto, que animais sacrificados 12 dias após o tratamento apresentavam redução menos expressiva da marcação pelo GFAP do que os animais sacrificados 6 dias após tratamento. Essa redução menos expressiva dos níveis em animais com maior tempo de “shunt” pode ser explicada por oclusão parcial do cateter devido ao crescimento de tecido cicatricial em direção ao cateter distal, prejudicando então seu funcionamento e levando a reativação de células gliais. Esse mecanismo pode ser extrapolado para o presente estudo, em que a obstrução do cateter foi intencionalmente realizada. Nesses animais, a reação astrocítica, especialmente na substância branca periventricular, foi notadamente mais intensa que nos demais grupos.

A apreciação das lâminas da matriz germinativa evidenciou diferenças entre todos os grupos. Como descrito anteriormente, o grupo controle apresenta grande quantidade de células na matriz, com menor densidade astrocítica em comparação ao grupo HNT, cujos astrócitos

apresentam prolongamentos mais espessos e evidentes. Nota-se novamente a redução do volume celular no grupo não tratado em comparação aos demais grupos.

As lâminas dos grupos cirúrgicos demonstraram maior número e maior intensidade da marcação em relação aos grupos controle e HNT. O grupo HTOT não apenas demonstrou maior intensidade da reação astrocitária em relação aos grupos controle ($p=0,01$) e ao grupo HT ($p=0,03$), como também uma tendência de maior número de astrócitos reativos em relação aos demais grupos ($p=0,06$). Apesar da não relevância estatística, achados semelhantes foram descritos nas lâminas do corpo caloso. A intensa reação astrocitária no grupo HTOT, associada a menor quantidade de células que compõem a matriz, podem corresponder a um dos achados que resultariam nas alterações histopatológicas irreversíveis que as sucessivas descompensações da hidrocefalia podem acarretar.

A análise do córtex adjacente ao corpo caloso mostrou grande diferença do grupo controle em relação aos demais grupos, apresentando não apenas menor densidade celular astrocitária ($p<0,01$), mas também uma menor intensidade da reação ($p=0,03$), demonstrando prolongamentos menores e menos visíveis. O grupo HTOT, na análise qualitativa de suas lâminas, assim como nas regiões anteriormente descritas, apresentou maior densidade e intensidade da reação astrocitária em comparação aos demais grupos.

Notou-se, no presente estudo, que a reação astrocitária no córtex adjacente ao corpo caloso foi menos evidente nessa região quando em comparação às regiões periventriculares. Esses achados já foram descritos em diversos estudos sobre hidrocefalia experimental encontrados na literatura médica. Del Bigio e Zhang (1998) e Del Bigio *et al.* (2003) estudaram a reação astrocitária em ratos Sprague-Dawley com hidrocefalia induzida por caulim e observaram que as alterações reativas das células astrogliais era muito mais evidentes na substância branca periventricular do que no córtex desses animais, mesmo nos casos de hidrocefalia acentuada.

Entretanto, conforme já descrito anteriormente, os grupos com hidrocefalia não tratada e os grupos submetidos a tratamento cirúrgico demonstraram reação astrocitária mais intensa que os animais do grupo controle. No presente estudo, o grupo que teve o *shunt* obstruído apresentou reação astrocitária mais intensa, seguida do grupo hidrocefálico tratado e grupo hidrocefálico não tratado.

O mesmo padrão pode ser observado nas subáreas CA1 e CA2 do hipocampo: os grupos submetidos ao tratamento cirúrgico demonstraram uma densidade astrocitária maior que os demais;

a intensidade da reação foi variada. No giro denteado ficou evidente o maior número de astrócitos reativos nos grupos com hidrocefalia não tratada e com shunt obstruído em comparação aos demais.

Em contraste com as demais regiões, em CA3, os grupos controle e hidrocefálico tratado apresentaram densidade celular discretamente maior que os grupos com hidrocefalia não tratada e com shunt obstruído.

Estudo realizado por Miller e McAllister II (2007) avaliou quantitativamente a imunomarcção pelo GFAP que ocorre em resposta ao tratamento da hidrocefalia no córtex parietal e occipital de ratos H-Tx. Apesar da redução dos níveis do GFAP observados em ambas as regiões, a redução no córtex occipital foi mais dramática. Essa diferença de resposta entre as regiões pode ser justificada pela maior gravidade da lesão causada pela hidrocefalia no córtex occipital, tendo o tratamento uma resposta proporcionalmente mais evidente.

Uma possível explicação para a presença da intensa reação astrocitária no grupo que teve o shunt obstruído seria o efeito cumulativo das lesões causadas pela hidrocefalia antes do tratamento e após a obstrução do cateter. Além disso, considerando o possível efeito benéfico da reação astrocitária na reconstituição do tecido cerebral (AOYAMA *et al.*, 2006), a intensa imunomarcção com GFAP pode também estar associada ao tratamento da hidrocefalia. Em contraste com o grupo hidrocefálico tratado, em que a eutanásia foi realizada 21 dias após o procedimento, a eutanásia no grupo que teve o *shunt* obstruído foi realizada apenas 3 dias após o segundo tratamento (desobstrução do cateter), reduzindo então o tempo disponível para que ocorresse a redução da resposta astrocitária nesse grupo.

Sabe-se que a reação astrocitária ocorre em resposta a lesão cerebral decorrente da hidrocefalia. A lesão tecidual resulta de mecanismos primários diretos (mecânicos) e secundários reacionais, que envolvem cascatas bioquímicas que contribuem para o dano tecidual tardio e morte celular. Historicamente, as pesquisas envolvendo lesão cerebral secundária tiveram como enfoque os mecanismos relacionados a necrose celular. Entretanto, diversos estudos sugerem que a apoptose celular tem papel relevante na perda celular que ocorre em resposta a insultos agudos ao sistema nervoso, como traumatismo intracraniano ou isquemia, e doenças neurodegenerativas crônicas, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington ou esclerose lateral amiotrófica (YAKOVLEV; FADEN, 2001)

No presente estudo, utilizando a imunomarcção pela caspase-3, foram analisadas lâminas dos córtices cerebrais adjacentes ao corpo caloso e ao hipocampo quanto a presença de células apoptóticas.

Os achados foram contrastantes entre as diferentes regiões. No córtex cerebral adjacente ao corpo caloso, a maior densidade de células apoptóticas foi encontrada no grupo HTOT, seguido do grupo controle; no córtex adjacente ao hipocampo, houve predomínio de células apoptóticas no grupo HTD, seguido do grupo HNT. Não houve relevância estatística nos achados.

Del Bigio e Zhang (1998) compararam a presença de células apoptóticas em ratos normais e com hidrocefalia induzida por caulim. Apesar do aumento significativo do número de células apoptóticas no grupo hidrocefálico em comparação ao grupo controle em todas as regiões analisadas, os resultados não tiveram relevância estatística. Curiosamente, 55% das células apoptóticas estavam localizadas na substância cinzenta, especialmente córtex dorsal e estriado. Di Curzio *et al* (2013), por sua vez, avaliaram os efeitos da hidrocefalia induzida pelo caulim em furões. Através da imunomarcção pela caspase-3, o encéfalo de furões hidrocefálicos foi comparado ao de furões controle quanto a presença de células apoptóticas na zona subventricular (correspondente a matriz germinativa), no giro denteado e na região do hipocampo. De modo geral, o grupo hidrocefálico apresentou número de células apoptóticas significativamente maior que os correspondentes do grupo controle na zona subventricular ($p=0,015$). No giro denteado e outras regiões do hipocampo, as diferenças foram menos gritantes.

As caspases são proteases ativadas por estímulos intrínsecos e extrínsecos. Estão envolvidas em processo de morte celular programada essenciais para o desenvolvimento cerebral, além de serem as efetoras na destruição de sinapses e conexões axonais aberrantes ou disfuncionais. (HYMAN; YUAN, 2012). Além disso, já foi demonstrado em diversos estudos que as caspases são também as indutoras da apoptose celular em resposta a estímulos traumáticos e isquêmicos (YAKOVLEV; FADEN, 2007). Apesar do mecanismo que levou ao início do processo de apoptose, as células em processo de morte celular só podem ser visualizadas por um curto período de tempo antes de seu desaparecimento (THOMAIDOU *et al*, 1997).

No presente estudo, esses fatores podem ter influenciado nas diferenças encontradas nos achados entre as duas regiões analisadas. Primeiramente, não foi possível diferenciar, pelos testes realizados, se a imunomarcção celular pela caspase deu-se em resposta ao dano induzido pela hidrocefalia ou se corresponde a morte celular programada que ocorreria durante o

desenvolvimento cerebral. Isso não apenas explicaria o predomínio dessas células no grupo HNT e possivelmente no grupo HTOT no córtex adjacente ao corpo caloso, região mais gravemente afetada pela hidrocefalia, como também poderia justificar o predomínio das células com imunomarcção para caspase nos grupos controle e no grupo HTD no córtex adjacente ao hipocampo. Ademais, a avaliação foi realizada no 28º dia após o nascimento em todos os animais de todos os grupos: a análise das lâminas em um único período não permite determinar de maneira conclusiva em quais grupos e em quais regiões houve a maior taxa de morte celular por apoptose.

Além das consequências relacionadas a reação astrocitária e à morte celular por apoptose, diversos estudos sugerem que a reação inflamatória também é responsável pelo dano cerebral causado pela hidrocefalia. No presente estudo, o estudo imunistoquímico para COX-2 foi utilizado para identificação de células com atividade inflamatória.

A COX é uma enzima que catalisa a transformação do ácido araquidônico em várias substâncias bioativas, conhecidas como prostaglandinas. Existem dois tipos principais de COX: COX-1, expressa de forma constitutiva em todos os tecidos do corpo e a COX-2, cuja expressão ocorre em resposta a fatores de crescimento, citocinas e moléculas pró-inflamatórias (LÓPEZ;BALLAZ, 2020; MINGHETTI, 2004). O aumento da expressão da COX-2 tem sido associado a neurotoxicidade em insultos agudos ao sistema nervoso, como hipóxia, isquemia e crises convulsivas (MINGHETTI, 2004).

Entretanto, fortes evidências sugerem que a COX-2 exerce também funções neuronais fisiológicas essenciais. Diversos trabalhos na literatura mostraram que a COX-2 é constitutivamente expressa em alguns órgãos como rins, testículos e cérebro. A imunorreatividade pela COX-2 já foi demonstrada em áreas distintas do córtex cerebral e hipocampo, tanto em espécimes humanos como em ratos. Em cérebros humanos, especificamente, ambas as isoformas, COX-1 e COX-2, estão presentes em diversas áreas, sendo esta última a forma predominante especialmente no hipocampo. (MINGHETTI, 2004; SHARIFZADEH *et al.*, 2005). Em cérebros de ratos, a expressão fisiológica da COX-2 ocorre em células neuronais, induzida como resposta ao estímulo sináptico excitatório pelo glutamato; em contraste, na resposta inflamatória, a expressão da COX-2 ocorre principalmente em astrócitos e na micróglia (LÓPEZ; BALLAZ, 2020).

A COX-2 é expressa em dendritos e corpos celulares de neurônios do córtex temporal, amígdala e hipocampo, sendo sua expressão dinamicamente regulada pela atividade sináptica que

ocorre de maneira fisiológica. Esses achados sugerem que a COX-2 está envolvida na plasticidade neuronal, e, possivelmente, na sinalização celular e neurotransmissão (SHARIFZADEH *et al.*, 2005). O alto nível de expressão da COX-2 no hipocampo, especialmente em CA1, resultou na hipótese de que essa enzima exerce importante função na aquisição e processamento da memória espacial (KAUFFMANN *et al.*, 1996).

Diversos estudos corroboraram essa hipótese. Rall et al (2003) demonstrou que a infusão hipocampal de um inibidor da COX-2 prejudicou a aquisição da memória espacial em ratos *Long-Evans* no teste do labirinto aquático de Morris. Já Teather et al. (2002) utilizaram um inibidor da COX-2 imediatamente após o treino para o teste do labirinto aquático e encontraram um prejuízo na aquisição da memória espacial no teste realizado 24h após o treino. Sharifzadeh et al. (2005), através da infusão de inibidor seletivo da COX-2 diretamente sobre CA1 de ratos *Wistar*, observaram que houve déficits na aquisição da memória espacial nestes animais que perduraram por pelo menos 72h após a infusão da medicação.

No presente estudo, a avaliação qualitativa das lâminas demonstrou uma grande porcentagem de células marcadas no grupo HTOT em comparação aos demais grupos, tanto no corpo caloso quanto na matriz germinativa. A análise estatística comprovou esses achados apenas na matriz germinativa ($p=0,02$), sendo a porcentagem no grupo HTOT maior em relação ao grupo controle ($p<0,01$) e ao grupo HTD ($p=0,04$). Podemos inferir a partir desses resultados que a resposta inflamatória nessas regiões foi maior no grupo com shunt obstruído em relação aos demais grupos. Conforme já discutido anteriormente, é bem estabelecido que a lesão secundária a hidrocefalia é mais grave na substância branca periventricular. Apesar de não ser possível a distinção do tipo celular em que ocorreu a imunomarcação pela COX-2, os resultados da análise por GFAP demonstraram que o número de células astrocitárias no grupo HTOT foi maior nessas regiões. Por essa razão, é provável que a imunomarcação pela COX-2 nesse grupo tenha ocorrido principalmente em células gliais, resultando em neuroinflamação.

Já no córtex cerebral, tanto na região adjacente ao corpo caloso quanto ao hipocampo, a imunomarcação por COX-2 foi progressivamente maior nos grupos controle, HNT e HTD. Esses achados podem refletir que houve não apenas reação inflamatória secundária a hidrocefalia, como também em resposta à presença do cateter ventricular. O grupo HTOT, por sua vez, apresentou grande variação na porcentagem de imunoexpressão pela COX-2, demonstrando uma elevada

porcentagem de células marcadas no córtex adjacente ao corpo caloso, porém uma baixa porcentagem na região adjacente ao hipocampo.

Na análise das subáreas do hipocampo, a maior discrepância na marcação deu-se em CA3 e no giro denteado, tendo o grupo HTOT apresentando porcentagem bem menor de células marcadas em relação aos demais grupos. Considerando a possível função da COX-2 na aquisição de memória espacial, a menor porcentagem de células marcadas no grupo HTOT pode justificar o pior desempenho desses animais no teste do labirinto aquático de Morris. Nas demais regiões, a porcentagem de células com imunomarcação para COX-2 foi bem semelhante, podendo refletir um menor grau de lesão nessas áreas do hipocampo.

Para avaliar os efeitos da hidrocefalia na população de células neuronais, foi utilizada a imunomarcação pelo Neu-N. O Neu-N é um antígeno neuronal predominantemente expresso no núcleo celular e, em menor grau, no citoplasma perinuclear. Ele emerge durante a embriogênese em neuroblastos pós-mitose e permanece tanto em neurônios em diferenciação como também em neurônios já diferenciados. (DUAN *et al*, 2016; GUSELNIKOVA; KORZHEVSKIY, 2015).

No presente estudo, foram analisadas a densidade e a porcentagem de células com imunomarcação para Neu-N. Diferente do que seria esperado, a avaliação qualitativa das lâminas do córtex cerebral adjacente ao corpo caloso evidenciou maior número de células neuronais no grupo HTOT com relação aos demais grupos, tanto no córtex cerebral adjacente ao corpo caloso ($p=0,03$) quanto ao hipocampo ($p<0,01$). Entretanto, quando analisadas as porcentagens de células marcadas, as diferenças foram menos evidentes. Esses achados mostram que, de maneira geral, o grupo submetido a diversas abordagens cirúrgicas apresenta uma maior densidade celular por área avaliada. Apesar de terem sido realizadas análises apenas para pesquisa de astrócitos reativos, pode-se inferir que nesse grupo houve também aumento da população de outras células gliais. O aumento da população de células neuronais pode refletir uma tentativa de aumento da proliferação celular em resposta aos insultos causados tanto pela hidrocefalia quanto pelos tratamentos instituídos.

Nas subáreas do hipocampo, a densidade de células neuronais também foi maior no grupo HTOT em relação aos demais grupos em todas as regiões avaliadas. Apesar da aparente menor gravidade da lesão causada pela hidrocefalia na região do hipocampo, os mesmos mecanismos que justificam a maior densidade celular no grupo HTOT pode ser aplicada a esta região.

É bem conhecido que o caulim é uma ferramenta efetiva para indução da hidrocefalia em animais; apesar disso, o grau de hidrocefalia é variável e imprevisível (KHAN *et al.*, 2006). Devido a essa variação e imprevisibilidade, animais com diferentes graus de hidrocefalia compuseram os grupos, o que pode afetar a resposta ao tratamento e a gravidade das alterações comportamentais e histopatológicas dentro de um mesmo grupo.

Foram utilizados animais recém-nascidos visando simular o contexto da hidrocefalia congênita em seres humanos. Tendo em vista que o desenho do estudo envolve a realização de múltiplos procedimentos com necessidade de anestesia (cirurgia e ultrassonografia), o número de animais que não resistiram ao experimento foi grande, impossibilitando atingir um número maior de animais por grupos. Além disso, o intervalo entre os procedimentos e os testes comportamentais foi relativamente curto, podendo a ação anestésica interferir de maneira imprevisível nos resultados obtidos.

Este trabalho teve como objetivo principal avaliar as possíveis alterações comportamentais e histopatológicas resultantes da recorrência da hidrocefalia pela obstrução da derivação, situação prevalente na prática clínica. Apesar das limitações já citadas anteriormente, a partir de um modelo já utilizado para tratamento da hidrocefalia em ratos, a derivação ventriculo-subcutânea, foi desenvolvida uma nova técnica que permite simular a principal causa de mau funcionamento das derivações ventriculares: a obstrução dos *shunts*. Até o presente momento, consiste em estudo inédito na literatura médica. A partir do modelo desenvolvido neste trabalho, pode-se implementar novos desenhos de estudos, visando minimizar os vieses encontrados no curso deste experimento. O modelo provou-se factível e eficiente na simulação da obstrução das derivações.

8 Conclusão

As alterações histopatológicas secundárias à hidrocefalia não se restringem a lesão mecânica por estiramento da substância branca periventricular. Mecanismos secundários de lesão foram descritos, incluindo desde lesão axonal direta como também desmielinização, morte celular, alterações metabólicas e nos neurotransmissores, resultantes da alteração do fluxo sanguíneo regional (MCALLISTER *et al.*, 2016). A análise dos efeitos da obstrução da derivação ventrículo-subcutânea, com recorrência da hidrocefalia, permitiu-nos concluir que:- o ganho de peso dos animais do grupo HTOT foi menor com relação a todos os demais grupos;

- O grupo HTOT apresentou pior desempenho no teste do campo aberto em relação aos demais grupos, especialmente na capacidade de exploração vertical e de auto-limpeza;

- O desempenho no teste do labirinto aquático também foi inferior no grupo com derivação obstruída, que apresentou maior tempo para chegar a plataforma; apesar deste achado, ainda há preservação da memória espacial, demonstrado pela redução significativa do tempo de chegada à plataforma na segunda fase do experimento realizada no P19 e P20;

- Houve redução da espessura do corpo caloso em todos os animais hidrocefálicos, com recuperação parcial com o tratamento com derivação; o grupo HTOT teve a espessura reduzida em relação ao grupo tratado;

- Houve perda da citoarquitetura em todos os animais hidrocefálicos, com recuperação parcial nos grupos tratados, sendo esta recuperação mais evidente no grupo sem obstrução do *shunt*;

- A astrocitose reativa foi qualitativamente mais evidente no grupo com derivação obstruída, especialmente no corpo caloso e na matriz germinativa;

- Não houve diferença entre os grupos na análise da presença de células apoptóticas;

- A imunomarcagem para COX-2 foi maior no corpo caloso e na matriz germinativa no grupo HTOT, revelando uma maior resposta inflamatória neste grupo; nas subáreas do hipocampo, por sua vez, o grupo HTOT demonstrou a menor taxa de células imunomarcadas, podendo o comprometimento da memória ser explicada por esse achado;

- O grupo hidrocefálico não tratado mostrou a menor densidade de células neuronais em comparação aos demais grupos;

- O modelo de obstrução da derivação com posterior desobstrução foi efetivo em reproduzir as alterações das dimensões ventriculares esperadas após cada procedimento, permitindo sua utilização em novos estudos.

9 Referências

ABU-ZIDAN, F. M.; HEFNY, A. F.; CORR, Peter. Clinical ultrasound physics. **J Emerg Trauma Shock**, v. 4, n.4, p. 501-503, out. 2011.

ALDRICH, J. E.. Basic physics of ultrasound imaging. **Crit Care Med**, v. 35, n., p. 131-137, maio 2007.

AOYAMA, Y.; KINOSHITA, Y.; YOKOTA, A.; HAMADA, T. Neuronal damage in hydrocephalus and its restoration by shunt insertion in experimental hydrocephalus: a study involving the neurofilament-immunostaining method. **J Neurosurg Ped**, v. 104, n. 5, p. 332-339, maio 2006.

BABAPOUR, B.; OI, S.; BOOZARI, B.; TATAGIBA, M.; BLECK, J.; HUSSEIN, S.; SAMII, M. Fetal hydrocephalus, intrauterine diagnosis and therapy considerations: an experimental rat model. **Childs Nerv Syst**, v. 21, n. 5, p. 365-371, 10 fev. 2005.

BARF, H. A; VERHOEF, M.; JENNEKENS-SCHINKEL, A.; POST, M. W.; GOOSKENS, R. H.; PREVO, A. J. H. Cognitive status of young adults with spina bifida. **Dev Med Child Neurol**, v. 45, n. 12, p.813-820, dez. 2003.

BROWN, J. A.; RACHLIN, J.; RUBIN, J. M.; WOLLMANN, R. L.. Ultrasound evaluation of experimental hydrocephalus in dogs. **Surg Neurol**, v. 22, n. 3, p. 273-276, set. 1984.

CARDOSO, E. J. R.; LACHAT, J. J.; LOPES, L. S.; SANTOS, A. C.; COLLI, B. O. Changes caused by hidrocephalus, induced by kaolin, in the corpus callosum of adult dogs. **Acta Cir Bras**, v. 26, n. 2, p. 8-14, 2011. FapUNIFESP (SciELO).

CATALÃO, C. H. R.; CORREA, D. A. L.; GARCIA, C. A. B.; SANTOS, A. C.; SALMON, C. E. G.; ROCHA, M. J. A.; LOPES, L. S. Pre- and Postshunting magnetization transfer ratios are in accordance with neurological and behavioral changes in hydrocephalic immature rats. **Dev Neurosci**, n. 36, p. 520-532, out. 2014.

CHAKRABORTY, A.; DRAKE, J. M.; WARF, B. C. Methods for Cerebrospinal Fluid Diversion in Pediatric Hydrocephalus: Front Shunt to Scope. In QUIÑONES-HINOJOSA, Alfredo (Ed.). **Operative Neurosurgical Techniques: indications, methods, results**. 6th edition. Philadelphia.

CHAUDRY, P.; KHARKAR, S.; HEIDLER-GARY, J.; HILLIS, A. E.. NEWHART, M.; KLEINMAN, J. T.; DAVIS, C.; RIGAMONTI, D.; WANG, P.; IRANI, D. N.; WILLIAMS, M. A. Characteristics and reversibility of dementia in Normal Pressure Hydrocephalus. **Behav Neurol**, n. 18, p. 149-158, 2007.

CHI, J. H.; FULLERTON, H. J.; GUPTA, N. Time trends and demographics of deaths from congenital hydrocephalus in children in the United States: national center for health statistics data, 1979 to 1998. **J Neurosurg: Pediatrics**, v. 103, n. 2, p. 113-118, ago. 2005.

CINALLI, G.; SPENNATO, P.; BUONOCORE, M. C.; CIANCIULLI, E.; VINCHON, M.; SGOUROS, S. Pathophysiology of Hydrocephalus. **The Spina Bifida**, p. 203-213, jan. 2008.

DEACON, R. M. J. Measuring motor coordination in mice. **J Vis Exp**, n.75, p. e2609, maio. 2013.

DEL BIGIO, M. R.; BRUNI, J. E.; FEWER, H. D. Human neonatal hydrocephalus. **J Neurosurg**, v. 63, n. 1, p. 56-63, jul. 1985.

DEL BIGIO, M. R.; BRUNI, J. E. Changes in periventricular vasculature of rabbit brain following induction of hydrocephalus after shunting. **J Neurosurg**, v.69, p. 115-120, jul. 1988.

DEL BIGIO, M. R. Neuropathological changes caused by hydrocephalus. **Acta Neuropathol**, v. 85, n. 6, p. 573-585, maio 1993.

DEL BIGIO, M. R. Biological Reactions to Cerebrospinal Fluid Shunt Devices: a review of the cellular pathology. **Neurosurg**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 319-326, 1 fev. 1998.

DEL BIGIO, M. R.; ZHANG, Y. W.. Cell Death, Axonal Damage, and Cell Birth in the Immature Rat Brain Following Induction of Hydrocephalus. **Exp Neurol**, v. 154, n. 1, p. 157-169, nov. 1998.

DEL BIGIO, M. R. Future Directions for Therapy of Childhood Hydrocephalus: a view from the laboratory. **Ped Neurosurg**, v. 34, n. 4, p. 172-181, 2001.

DEL BIGIO, M. R. Pathophysiologic Consequences of Hydrocephalus. **Neurosurg Clin N Am**, v. 12, n. 4, p. 639-649, out. 2001.

DEL BIGIO, M. R.; WILSON, M. J.; ENNO, Terry. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. **Ann Neurol**, v. 53, n. 3, p. 337-346, 24 fev. 2003.

DEL BIGIO, M. R. Cellular Damage and Prevention in Childhood Hydrocephalus. **Brain Pathol**, v. 14, n. 3, p. 317-324, 5 abr. 2006.

DEL BIGIO, M. R. Neuropathology and structural changes in hydrocephalus. **Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 16, n. 1, p. 16-22, 2010.

DEL BIGIO, M. R.; KHAN, O. H.; LOPES, L. S.; JULIET, P. A. R..Cerebral White Matter Oxidation and Nitrosylation in Young Rodents With Kaolin-Induced Hydrocephalus. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 71, n. 4, p. 274-288, abr. 2012.

DEWAN, M. C.; RATTANI, A.; MEKARY, R.; GLANCZ, L. J.; YUNUSA, I.; BATICULON, R. E.; FIEGGEN, G.; WELLONS, J. C.; PARK, K. B.; WARF, B. C. Global hydrocephalus

epidemiology and incidence: systematic review and meta-analysis. **J Neurosurg**, v. 130, n. 4, p. 1065-1079, abr. 2019.

DI ROCCO, C.; FRASSANITO, P. Hydrocephalus: Generalities and Clinical Presentations. In: DI ROCCO, C.; PANG, D.; RUTKA, J. T. (Eds.) **Textbook of Pediatric Neurosurgery**. 1st ed. Springer, 2020.

DINÇER, A; ÖZEK, M. M. Radiologic evaluation of pediatric hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 27, n. 10, p. 1543-1562, 17 set. 2011.

DUAN, W.; ZHANG, Y. P.; HOU, Z.; HUANG, C.; ZHU, H.; ZHANG, C. Q.; YIN, Q. Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator. **Mol Neurobiol**, v. 53, n.3, p. 1637-1647, fev. 2015.

ESCARTIN, C. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nat Neurosci**, v. 24, n.3, p. 312-325, mar. 2021. New York.

ESKANDARI, R.; PACKER, M.; BURDETT, E. C.; MC ALLISTER II, J. P. Effect of delayed intermittent ventricular drainage on ventriculomegaly and neurological deficits in experimental neonatal hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 28, p. 1849-1861, jul. 2012.

FRIEDE, R.L. A quantitative study of myelination in hydrocephalus (factors controlling glial proliferation in myelination). **J Neuropathol Exp Neurol**, v.21, p. 645-648, out. 1962.

GUSELNIKOVA, V. V.; KORZHEVSKIY, D. E. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. **Acta Naturae**, v. 7, n.2, p. 42-47, abr. 2015.

HANAK, B. W.; BONOW, R. H.; HARRIS, C. A.; BROWD, S. R. Cerebrospinal Fluid Shunting Complications in Children. **Ped Neurosurg**, v. 52, n. 6, p. 381-400, mar. 2017.

HYMAN, T. T.; YUAN, J. Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 6, p. 395-406, mai 2012.

HOPPE-HIRSCH, E.; LAROUSSINIE, F.; BRUNET, L.; SAINTE-ROSE, C.; RENIER, D.; CINALLI, G.; ZERAH, M.; PIERRE-KAHN, A.. Late outcome of the surgical treatment of hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 14, n. 3, p. 97-99, mar. 1998.

JAMIL, O.; KESTLE, J. R.W. Hydrocephalus in Children: Etiology and Overall Management. In: WINN, Richard (Ed.). **Youmans neurological surgery**. 7th ed./Philadelphia; W. B. Saunders, 2016.

KAUFFMANN, W. E.; WORLEY, P. F.; PEGG, J.; BREMER, M.; ISAKSON, P. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. **Proc Natl Acad Sci**, v. 93, p. 2317-2321, mar. 1996.

KHAJEH, M. R.; BANNISTER, C. M.; MIYAN, J. A. Study of the Motor Corticospinal System in the Developing Rat Fetus: Comparison of Wistar and Normal and Hydrocephalic HTx Rats. **Eur J Pediatr Surg**, v. 12 Suppl 1, p. S3–5, dez. 2002.

KHAN, O. H.; ENNO, T. L.; BIGIO, M. R. Brain damage in neonatal rats following kaolin induction of hydrocephalus. **Exp Neurol**, v. 200, n. 2, p. 311-320, ago. 2006.

LAM, S.; HARRIS, D.; ROCQUE, B. G.; HAM, S. A. Pediatric endoscopic third ventriculostomy: a population-based study. **J Neurosurg Ped**, v. 14, n. 5, p. 455-464, nov. 2014.

LOPES, L. S.; SLOBODIAN, I.; DEL BIGIO, M. R. Characterization of juvenile and young adult mice following induction of hydrocephalus with kaolin. **Exp Neurol**, v. 219, n. 1, p. 187-196, set. 2009.

LÓPEZ, D. E.; BALLAZ, S. J. The Role of Brain Cyclooxygenase-2 (Cox-2) Beyond Neuroinflammation: Neuronal Homeostasis in Memory and Anxiety. **Mol Neurobiol**, v. 57, n. 12, p. 5167–5176, dez. 2020.

MCALLISTER, J. P. Pathophysiology of congenital and neonatal hydrocephalus. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 17, n. 5, p. 285-294, out. 2012.

MCALLISTER, J. P., 2nd; WILLIAMS, M. A.; WALKER, M. L.; KESTLE, J. R. W.; RELKIN, N. R.; ANDERSON, A. M.; GROSS, P. H.; BROWD, S. R.; HYDROCEPHALUS SYMPOSIUM EXPERT PANEL. An Update on Research Priorities in Hydrocephalus: Overview of the Third National Institutes of Health-Sponsored Symposium “Opportunities for Hydrocephalus Research: Pathways to Better Outcomes”. **J Neurosurg**, v. 123, n. 6, p. 1427–1438, dez. 2015.

MCALLISTER, J. P., ESKANDARI, R.; LIMBRICK, D. D. Experimental Hydrocephalus. In: WINN, Richard (Ed.). **Youmans neurological surgery**. 7th ed./Philadelphia; W. B. Saunders, 2016.

MILLER, J. M.; MCALLISTER, J. P., 2nd. Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus. **Cerebrospinal Fluid Res**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 7 jun. 2007.

MINGHETTI, L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 63, n. 9, p. 901–910, set. 2004.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J Neurosci Methods**, v.11, p. 47-60, abr. 1984.

NAGRA, G.; BIGIO, M. R. Pathology of Pediatric Hydrocephalus. **Ped Hydrocephalus**, p. 1-25, 2018.

NAGY, A.; BOGNAR, L.; PATAKI, I.; BARTA, Z.; NOVAK, L. Ventriculosubgaleal shunt in the treatment of posthemorrhagic and postinfectious hydrocephalus of premature infants. **Childs Nerv Syst**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 413-418, 4 dez. 2012.

NOJIMA, Y.; ENZAN, H.; HAYASHI, Y.; NAKAYAMA, H.; KIYOKU, H.; HIROI, M.; MORI, K. Neuroepithelial and Ependymal Changes in HTX Rats with Congenital Hydrocephalus: An Ultrastructural and Immunohistochemical Study. **Pathol Int**, v. 48, n. 2, p. 115–125, fev. 1998.

OI, S.; ROCCO, C. Proposal of “evolution theory in cerebrospinal fluid dynamics” and minor pathway hydrocephalus in developing immature brain. **Childs Nerv Syst**, v. 22, n. 7, p. 662-669, 10 maio 2006.

OLIVEIRA, R. S.; MACHADO, H. R. Transcranial color-coded Doppler ultrasonography for evaluation of children with hydrocephalus. **Neurosurg Focus**, v. 15, n. 4, p. 1-7, out. 2003.

OSBORN, A. G.; HEDLUND, G. L.; SALZMAN, K. L. **Osborn’s Brain Imaging, Pathology, and Anatomy**. 2nd edition. Philadelphia.

OWEN-LYNCH, P. J.; DRAPER, C. E.; MASHAYEKHI, F.; BANNISTER, C. M.; MIYAN, J. A. Defective Cell Cycle Control Underlies Abnormal Cortical Development in the Hydrocephalic Texas Rat. **Brain J Neurol**, v. 126, n. Pt 3, p. 623–631, mar. 2003.

PAFF, M.; ALEXANDRU-ABRAMS, D.; MUHONEN, M.; LOUDON, W. Ventriculoperitoneal shunt complications: a review. **Interdiscip Neurosurg**, v. 13, p. 66-70, set. 2018.

PRIGATANO, J. P.; ZEINER, H. K.; POLLAY, M.; KAPLAN, R. J. Neuropsychological Functioning in Children with Shunted Uncomplicated Hydrocephalus. **Childs Brain**, v. 10, n.2, p. 112-120, 1983.

RAHMAN, S.; TEO, C; MORRIS, W.; LAO, D.; BOOP, F. A. Ventriculosubgaleal shunt: a treatment option for progressive posthemorrhagic hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 11, n. 11, p. 650-654, nov. 1995.

RAIMONDI, A. J. A unifying theory for the definition and classification of hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 10, n. 1, p. 2-12, jan. 1994.

RALL, J. M.; MACH, S. A.; DASH, P. K. Intrahippocampal Infusion of a Cyclooxygenase-2 Inhibitor Attenuates Memory Acquisition in Rats. **Brain Res**, v. 968, n. 2, p. 273–276, 11 abr. 2003.

REKATE, H. L. A Contemporary Definition and Classification of Hydrocephalus. **Seminars Ped Neurol**, v. 16, n. 1, p. 9-15, mar. 2009.

REKATE, H. L. A consensus on the classification of hydrocephalus: its utility in the assessment of abnormalities of cerebrospinal fluid dynamics. **Childs Nerv Syst**, [S.L.], v. 27, n. 10, p. 1535-1541, 17 set. 2011.

RIVA-CAMBRIN, J.; DETSKY, A. S.; LAMBERTI-PASCULLI, M.; SARGENT, M. A.; ARMSTRONG, D.; MOINEDDIN, R.; COCHRANE, D. D.; DRAKE, J. M. Predicting postresection hydrocephalus in pediatric patients with posterior fossa tumors. **J Neurosurg Ped**, v. 3, n. 5, p. 378-385, maio 2009.

SALEH, A. S., HAMAD, A. A., AMMAR, A. Radiological Diagnosis of Hydrocephalus. In: Ammar, A. (eds) **Hydrocephalus**. Springer, 2017

SANTOS, M. V. **Análise dos efeitos clínico-radiológicos, histopatológicos e bioquímicos da derivação ventrículo-subcutânea na hidrocefalia induzida por caulim em ratos**. 2016. 124f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

SANTOS, M. V.; GARCIA, C. A. B.; JARDINI, E. O.; ROMEIRO, T. H.; LOPES, L. S.; MACHADO, H. R.; OLIVEIRA, R. S. de. Ventricular-subcutaneous shunt for the treatment of experimental hydrocephalus in young rats: technical note. **Childs Nerv Syst**, v. 32, n. 8, p. 1507-1511, 23 fev. 2016.

SILVA, G. A. P. de M.; SILVA, S. C.; BEGGIORA, P. S.; MATIAS JÚNIOR, I.; MENEZES-REIS, R.; SANTOS, M. V.; MACHADO, H. R.; LOPES, L. S. Transcranial ultrasonography as a reliable instrument for the measurement of the cerebral ventricles in rats with experimental hydrocephalus: a pilot study. **Childs Nerv Syst**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 26 fev. 2021.

SHARIFZADEH, M.; TAVASOLI, M.; SOODI, M.; MOHAMMADI-ERAGHI, S.; GHAHREMANI, M. H.; ROGHANI, A. A Time Course Analysis of Cyclooxygenase-2 Suggests a Role in Spatial Memory Retrieval in Rats. **Neurosci Res**, v. 54, n. 3, p. 171–179, mar. 2006.

SHARIFZADEH, M.; NAGHDI, N.; KHOSROVANI, S.; OSTAD, S. N.; SHARIFZADEH, K.; ROGHANI, A. Post-Training Intrahippocampal Infusion of the COX-2 Inhibitor Celecoxib Impaired Spatial Memory Retention in Rats. **Eur J Pharmacol**, v. 511, n. 2-3, p. 159–166, 28 mar. 2005.

STRATMANN, G.; SALL, J. W.; MAY, L. D. V.; LOEPKE, A. W.; LEE, M. T.. Beyond Anesthetic Properties: the effects of isoflurane on brain cell death, neurogenesis, and long-term neurocognitive function. **Anesth Analge**, v. 110, n. 2, p. 431-437, fev. 2010.

TATEM, K. S.; QUINN, J. L.; PHADKE, A.; YU, Q.; GORDISH-DRESSMAN, H.; NAGARAJU, K. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. **J Vis Exp**, n. 91, p. 51785, set. 2014.

TEATHER, L. A.; PACKARD, M. G.; BAZAN, N. G. Post-Training Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibition Impairs Memory Consolidation. **Learn Mem**, v. 9, n. 1, p. 41–47, Jan-Feb 2002.

THOMAIDOU, D.; MIONE, M. C.; CAVANAGH, J. F.; PARNAVELAS, J. G. Apoptosis and Its Relation to the Cell Cycle in the Developing Cerebral Cortex. **J Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 1075–1085, 1 fev. 1997.

VOORHES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nat Protoc**, v.1, n. 2, p. 848-858, 2006.

WILLIAMS, M.A.; MCALLISTER, J. P.; WALKER, M. L.; KRANZ, D. A.; BERGSNEIDER, M.; BIGIO, M. R.; FLEMING, L.; FRIM, D. M.; GWINN, K.; KESTLE, J. R. W. Priorities for hydrocephalus research: report from a National Institutes of Health sponsored workshop. **J Neurosurg Ped**, v. 107, n. 5, p. 345-357, nov. 2007.

WILLIAMS, M. T.; BRAUN, A. A.; AMOS-KROOHS, R. M.; MCALLISTER, J. P.; LINDQUIST, D. M.; MANGANO, F. T.; VORHEES, C. V.; YUAN, W. Kaolin-induced ventriculomegaly at weaning produces long-term learning, memory, and motor deficits in rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 35, n. 1, p. 7-15, 2 mar. 2014.

WINN, H. R.; YOUMANS, J. R. **Youmans neurological surgery**. 7th ed. / [edited by] H. Richard Winn. Philadelphia; W. B. Saunders, 2016.

WOLFSON, B. J.; MCALLISTER, J. P. 2nd; LOVELY, T. J.; WRIGHT, L. C.; MILLER, D. W.; SALOTTO, A. G. Sonographic evaluation of experimental hydrocephalus in kittens. **Am J Neuroradiol**, v. 10, n.5, p. 1065-1067, set-out. 1989.

YAKOVLEV, A. G.; FADEN, A. I. Caspase-Dependent Apoptotic Pathways in CNS Injury. **Mol Neurobiol**, v. 24, n. 1-3, p. 131-144, Aug-Dec 2001.

YAMADA, H.; YOKOTA, A.; FURUTA, A.; HORIE, A. Reconstitution of Shunted Mantle in Experimental Hydrocephalus. **J Neurosurg**, v. 76, n. 5, p. 856-862, maio 1992.

ZEINER, H. K.; PRIGATANO, G. P.; POLLAY, M.; BISCOE, C. B.; SMITH, R. V. Ocular motility, visual acuity and dysfunction of neuropsychological impairment in children with shunted uncomplicated hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 1, n. 2, p. 115-122, 1985.

10 Anexos

10.1 Aprovação pela Comissão de Ética no Uso em Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE
ANIMAIS

CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Regulamento | Estatuto | Regimento



AUTORIZAÇÃO

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *“Avaliação dos efeitos comportamentais e histopatológicos resultantes da obstrução de derivação ventrículo-subcutânea para tratamento de hidrocefalia induzida por caulim em ratos”*, registrado com o número do protocolo 081/2021, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Volpon Santos, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filó Chordata, subfiló Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 26 de julho de 2021.

Colaboradores: Stephanie Naomi Funo de Souza
Pâmella da Silva Beggiora
Stephanya Covas da Silva
Luiza da Silva Lopes

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade			<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			26/07/2021 a 15/12/2022	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Rato / Wistar-OLD	32	20g / 07 dias	Macho	Serviço de Biotério
Rato / Wistar-OLD	04	400g / 90 dias	Fêmeas	Serviço de Biotério

Ribeirão Preto, 26 de julho de 2021

Prof. Dr. Luiz Carlos C. Navegantes

Luiz Carlos C. Navegantes
Coordenador da CEUA/FMRP-USP