UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

THAÍS HELENA ROMEIRO

**Avaliação da resposta ao tratamento com Edaravone em ratos jovens
hidrocefálicos submetidos ou não à derivação liquórica**

Ribeirão Preto

2021

THAÍS HELENA ROMEIRO

**Avaliação da resposta ao tratamento com Edaravone em ratos jovens
hidrocefálicos submetidos ou não à derivação liquórica**

Versão Original

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

Área de concentração: Morfologia e
Medicina Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Luiza da
Silva Lopes.

Ribeirão Preto
2021

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.

Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Romeiro, Thaís Helena.

Avaliação da resposta ao tratamento com Edaravone em ratos jovens hidrocefálicos submetidos ou não à derivação liquórica / Thaís Helena Romeiro;

Orientadora: Prof.^a Dra. Luiza da Silva Lopes. – Ribeirão Preto, 2021.

84f. : il.

Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2021.

Versão Original

1. Hidrocefalia; 2. Edaravone; 3. Neuroproteção; 4. Derivação liquórica.

ROMEIRO, T.H. Avaliação da resposta ao tratamento com Edaravone em ratos jovens hidrocefálicos submetidos ou não à derivação liquórica. 2021. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências – Opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado às pessoas que sempre estiveram ao meu lado, me acompanhando, apoiando e principalmente, acreditando em mim: minha família!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que todos os dias da minha vida me deu forças para nunca desistir.

Ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À minha orientadora Luiza da Silva Lopes, por seu apoio, amizade, sua dedicação e competência.

À secretária do programa, Juliana Pischiotin da Silva Moraes, pela ajuda e paciência.

À Sandra Balero Penharvel Martins e ao Jorge Forjaz, sempre nos ajudando nas técnicas histológicas.

Ao Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, e ao Antônio Renato Meirelles, que sempre nos auxiliou.

Aos meus amigos do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância do Departamento de Cirurgia e Anatomia / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP – USP, principalmente à Stephanya Covas da Silva e à Pâmella da Silva Beggiora, sempre dispostas a me ajudar.

E, por fim, à CAPES, pelo auxílio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

ROMEIRO, T. H. **Avaliação da resposta ao tratamento com Edaravone em ratos jovens hidrocefálicos submetidos ou não à derivação liquórica.** 2021. 84f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A hidrocefalia é definida como um desequilíbrio entre a produção e a absorção do líquido cefalorraquidiano no interior dos ventrículos cerebrais e do espaço subaracnóideo. Tal condição causa sérios danos às estruturas do SNC e gera graves distúrbios neurológicos que nem sempre são revertidos com o tratamento instituído. Por este motivo, a busca por medidas neuroprotetoras é de extrema necessidade. O medicamento Edaravone já se mostrou benéfico na hidrocefalia experimental, porém, a associação deste medicamento com a cirurgia de derivação liquórica ainda não foi testada. O objetivo do trabalho foi avaliar em ratos jovens hidrocefálicos o efeito neuroprotetor do Edaravone juntamente com um sistema de derivação liquórica. Foram utilizados ratos com sete dias de vida submetidos à hidrocefalia pela injeção de caulim intracisternal, divididos em cinco grupos compostos com dez animais em cada: controle (C), hidrocefálico não tratado (HNT), hidrocefálico tratado com Edaravone (20mg/Kg/dia) (HTE), hidrocefálico tratado com derivação liquórica (HTD) e hidrocefálico tratado com derivação e Edaravone (HTDE). Foram realizados testes comportamentais, avaliação histológica, imunoistoquímica e bioquímica. Os resultados demonstraram que o Edaravone, especialmente quando associado à cirurgia de derivação liquórica, promove neuroproteção em ratos hidrocefálicos jovens, por reduzir a astrogliose reativa e diminuir a morte celular.

Palavras-chave: Hidrocefalia, Edaravone, Neuroproteção, Derivação liquórica.

ABSTRACT

ROMEIRO, T. H. Evaluation of response to treatment with Edaravone in young hydrocephalic rats submitted or not to CSF derivation. 2021. 84f. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Hydrocephalus is defined as an imbalance between the production and absorption of cerebrospinal fluid within the cerebral ventricles and the subarachnoid space. Such a condition causes serious damage to the CNS structures and generates serious neurological disorders that are not always reversed with the treatment instituted. For this reason, the search for neuroprotective measures is extremely necessary. The drug Edaravone has already been shown to be beneficial in experimental hydrocephalus, however, the association of this drug with CSF derivative surgery has not yet been tested. The objective of the work was to evaluate the neuroprotective effect of Edaravone in young hydrocephalic rats together with a CSF derivation system. Seven-day-old rats subjected to hydrocephalus by intracisternal kaolin injection were used, divided into five groups composed of ten animals in each: control (C), untreated hydrocephalic (HNT), hydrocephalic treated with Edaravone (20mg / kg / day) (HTE), hydrocephalic treated with CSF derivation (HTD) and hydrocephalic treated with derivation and Edaravone (HTDE). Behavioral tests, histological, immunohistochemical and biochemical tests were performed. The results showed that Edaravone, especially when associated with CSF surgery, promotes neuroprotection in young hydrocephalic rats, by reducing reactive astrogliosis and decreasing cell death.

Keywords: Hydrocephalus, Edaravone, Neuroprotection, CSF derivation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do Edaravone.....	19
Figura 2: Indução da hidrocefalia.....	27
Figura 3: Sistema de derivação ventrículo-subcutâneo.....	29
Figura 4: Sequência dos passos técnicos da cirurgia de derivação ventrículo-subcutâneo.....	29
Figura 5: Aplicação da injeção de 20mg/kg de Edaravone intraperitoneal.....	30
Figura 6: Rato hidrocefálico durante avaliação no teste de campo aberto.....	31
Figura 7: Piscina utilizada para realização do teste do Labirinto aquático de Morris modificado.....	33
Figura 8: Progressão linear do ganho de peso durante o experimento.....	40
Figura 9: Gráfico da média geral do ganho de peso durante os 21 dias de experimento.....	41
Figura 10: Desempenho dos animais no teste open field.....	44
Figura 11: Gráfico de comparação das médias obtidas em cada grupo no teste de <i>open field</i>	45
Figura 12: Gráfico de progressão linear do desempenho no teste water maze.....	47
Figura 13: Gráficos com as médias dos tempos obtidos no teste water maze.....	48
Figura 14: Fotomicrografias da avaliação histológica (HE) do CC.....	50
Figura 15: Fotomicrografias da avaliação histológica (HE) na MG.....	52
Figura 16: Gráfico de densidade da reação astrocitária no CC.....	54
Figura 17: Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP no CC.....	55
Figura 18: Gráfico de densidade da reação astrocitária na região da MG.....	56
Figura 19: Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP na matriz germinativa ...	57
Figura 20: Análise das células em divisão mitótica na matriz germinativa pela imunomarcção por Ki-67.....	58
Figura 21: Fotomicrografias de lâminas imunomarcadas com Ki-67 na região da matriz germinativa.....	59
Figura 22: Análise do córtex cerebral para imunomarcção de caspase-3.....	60
Figura 23: Fotomicrografias de lâminas imunomarcadas para caspase-3 na região do córtex cerebral.....	61
Figura 24: Análise da concentração de GFAP (mg/ g de tecido nervoso).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de soluções padrão de albumina.....	35
---	----

LISTA DE SIGLAS

AVCI	Acidente Vascular Cerebral Isquêmico
BCA	Bicinchonic Acid
CAT	Catalase
CC	Corpo Caloso
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB	3'3- Diaminobenzidina
DVE	Derivação Ventricular Externa
DVP	Derivação Ventrículooperitoneal
DVS	Derivação Ventrículo-Subcutâneo
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
ELISA	Enzyme- Linked Immunosorbent Assay
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GPx	Glutathione Peroxidase
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de Oxigênio
HE	Hematoxilina e Eosina
HNT	Hidrocefálico Não Tratado
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HTD	Hidrocefálico Tratado com Derivação
HTDE	Hidrocefálico Tratado com Derivação e Edaravone
IP	Intraperitoneal
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MG	Matriz Germinativa
N₂O	Óxido Nitroso
O₂	Oxigênio
PIC	Pressão Intracraniana
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Hidrocefalia	14
1.2. Estresse Oxidativo	16
1.3. Derivação Liquórica	17
1.4. Hidrocefalia Experimental	18
1.5. Neuroproteção e Edaravone	18
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1. Animais	26
4.2. Indução de hidrocefalia	26
4.3. Formação dos grupos experimentais	27
4.4. Derivação liquórica ventrículo-subcutâneo (DVS)	28
4.5. Administração do Edaravone	30
4.6. Estudos comportamentais	30
4.6.1. Teste de campo aberto (open field)	31
4.6.2. Labirinto aquático de Morris modificado (water maze)	32
4.7. Perfusão cerebral e dissecação de estruturas	33
4.8. Histoquímica e Imunoistoquímica	34
4.9. Quantificação de proteínas totais - Coomassie – Bradford	35
4.10. Quantificação de proteínas pelo método bioquímico ELISA	36
4.11. Documentação fotográfica	37
4.12. Análise estatística	37
5. RESULTADOS	39
5.1. Peso Corporal	39
5.2. Teste de campo aberto (open field)	41
5.3. Labirinto aquático de Morris modificado (water maze)	45
5.4. Avaliação Histológica	49
5.4.1. Coloração com hematoxilina e eosina	49
5.5. Avaliação imunoistoquímica	53
5.5.1. GFAP	53
5.5.2. Ki-67	58
5.5.3. Caspase-3	60
5.6. Análise bioquímica – GFAP	62
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÕES	74
8. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hidrocefalia

A hidrocefalia é definida com um desequilíbrio entre a produção e a absorção do líquido cefalorraquidiano (LCR) (KRISHNAN et al., 2019), e corresponde a uma das condições neurológicas que mais acometem o sistema nervoso central (SNC) durante o período neonatal e a infância. Atualmente é a enfermidade mais comum tratada por neurocirurgiões pediátricos, contabilizando, aproximadamente, dois milhões em gastos na área de saúde nos Estados Unidos todos os anos (DI CURZIO; TURNEN-BRANNEN; DEL BIGIO, 2014; REKATE, 2008). De acordo com estudos epidemiológicos, a doença apresenta prevalência global de 85:100.000 nascidos. Quando dividido por grupos de acordo com a idade, a predominância é de 88:100.000 na população pediátrica, 11:100.000 em adultos, 175:100.000 em idosos e 400:100.000 naqueles com mais de 80 anos de idade. A incidência é significativamente maior na África e na América do Sul, quando comparados a outros continentes (ISAACS et al., 2018).

A hidrocefalia pode ser classificada de acordo com a interpretação clínica de duas formas: obstrutiva (não comunicante) e não obstrutiva (comunicante). A obstrução do fluxo pode ocorrer em qualquer ponto de passagem do LCR, incluindo o sistema ventricular, cisternas e espaço subaracnóideo. A hidrocefalia obstrutiva ou não comunicante ocorre devido ao bloqueio da circulação líquórica, que pode ser causado por anomalias do aqueduto, lesão do 4º ventrículo, lesão ou má formação da fossa posterior, tumores, cistos e é mais comum em crianças. Já a hidrocefalia não obstrutiva (ou comunicante) é limitada a duas condições: hiperprodução de líquido decorrentes de neoplasias do plexo coróide ou pela diminuição da taxa de absorção do líquido na superfície do cérebro. Esta falha de reabsorção surge devido a processos obstrutivos no nível das granulações aracnóides de Pacchioni que impedem a drenagem líquórica (WELCH, 1980; HASLAM, 2000; CAVALCANTI; SALOMÃO, 2003).

A dilatação ventricular, principal característica da hidrocefalia, pode ocasionar diversas alterações prejudiciais às estruturas do SNC como o corpo caloso, epêndima, parênquima cerebral, substância branca e o córtex. Essas afecções comprimem os hemisférios cerebrais contra a superfície interna do crânio podendo romper o epitélio

e causar aumento na pressão intracraniana (PIC) (LOPES; MACHADO; LACHAT, 2003). Nos casos mais graves da doença, há também desnudamento do epêndima, compressão e estiramento do tecido periventricular, redução do conteúdo de mielina, isquemia, hipóxia, inflamação, aumento da pulsatilidade do líquido, edema cerebral e diminuição dos impulsos nervosos e suas sinapses. Pode ocorrer também a astrogliose, definida pela presença de astrócitos reativos que ingressam no tecido nervoso em substituição aos axônios e mielina lesionados no SNC (NORTON et al., 1992; SHOESMITH; BUIST; DEL BIGLIO, 2000; KAHLE et al., 2016).

Em alguns casos, pode-se verificar o ‘olhar do sol poente’, determinado pela compressão do recesso pineal, que se refere ao deslocamento temporário ou permanente dos globos oculares para baixo, com a pálpebra superior fixa. Trata-se de um sinal precoce de hipertensão intracraniana, que surge, provavelmente, devido à compressão do terceiro ventrículo dilatado sobre o nervo ocular comum. A presença de sequelas neurológicas depende da faixa etária e velocidade de instalação da doença, da perda de tecido neuronal, das lesões associadas e complicações do tratamento. Os casos mais graves podem evoluir para um importante comprometimento neuropsicomotor, com completa dependência para as atividades de vida diária. Em crianças maiores, adolescentes, adultos e idosos, os sintomas estão baseados na tríade da síndrome de hipertensão intracraniana, ou seja, cefaleia, vômitos, edema papilar e alterações da consciência, levando o paciente ao coma e até mesmo à morte (DRAKE, 2008; PRATES; ZANON-COLLANGE, 2005; STAUFFER, 1989; CUNHA, 2014).

O quadro clínico pode também variar de acordo com a faixa etária dos pacientes, estando relacionado com a causa primária ou doença de base, presença de outras malformações ou lesões cerebrais associadas, dimensão da obstrução ao trânsito liquórico e nível da PIC. No recém-nascido, a irritabilidade, letargia, vômitos e o crescimento anormal da calota craniana são os mais comuns. E, para esses, e lactentes que ainda possuem fontanela aberta, ocorre o aumento do perímetro encefálico, que pode ter seu fechamento adiado. Nessa fase, a medida do perímetro representa a avaliação clínica de maior importância no reconhecimento precoce da hidrocefalia. Muitos aspectos ainda devem ser levados em consideração, tais como, os métodos atuais de diagnóstico, tratamento e resultados, a baixa taxa de sobrevivência pós-derivação, pouca qualidade de vida dos pacientes, métodos adicionais para monitorar a função neurocognitiva e controle de variáveis como: o

fluxo liquórico, pressão ou pulsatilidade, abordagens interdisciplinares; compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e recuperação da função neuronal. Desta forma, é imprescindível garantir uma investigação mais aprofundada e proporcionar maior expansão de programas de treinamento inovadores (WILLIAMS et al., 2007).

1.2. Estresse Oxidativo

Das lesões ocasionadas pela hidrocefalia, há também a presença do estresse oxidativo, um processo contínuo e fisiológico que cumpre funções biológicas relevantes. Com isso, há a formação de radicais livres, caracterizados como átomos ou moléculas altamente reativas que possuem elétrons não emparelhados em sua última camada, que leva ao desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, e consequentemente a danos celulares (DREHER; JUNOD, 1996; JANSSEN et al., 2000; BARBOSA et al., 2010). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas contendo oxigênio que podem ser geradas de forma endógena durante o metabolismo celular normal, ou de forma exógena, quando o organismo é exposto a vários estímulos como exposição ao álcool, fumo, drogas, raio ultravioleta, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo está presente na hidrocefalia devido à compressão e estiramento do parênquima cerebral, que gera uma lesão tecidual através da peroxidação lipídica e possui efeito tóxico nas paredes dos vasos arteriais cerebrais. Por ser um órgão rico em ácidos poli-insaturados, o cérebro é um dos locais mais afetados pelo estresse oxidativo, há nele maior quantia de oxigênio sendo consumida, gerando, consequentemente, elevadas taxas de radicais livres a partir de EROs ou de nitrogênio (ERN) (FINKEL; HOLBROOK, 2000; HALLIWELL, 2000).

Nosso organismo, para se proteger das altas concentrações de EROs, possui três mecanismos de defesa: mecanismo de prevenção, eliminação das EROs e reparo de moléculas. O mecanismo de prevenção impede a formação dos radicais livres ou espécies não radicais. O de eliminação é formado por estruturas enzimáticas como catalase (CAT), que tem a função de converter H_2O_2 em H_2O e O_2 , glutathiona peroxidase (GPx) que converte H_2O_2 em H_2O , e superóxido dismutase (SOD) que converte O_2 em H_2O_2 , estes podem ser adquiridos por meio de respostas a estímulos agressores como: patógenos, fungos, insetos, ou até mesmo a exposição a raios ultravioletas. E, também, através de meios não enzimáticos, como: tocoferóis, ácido

ascórbico e polifenóis (provenientes da dieta). Já o mecanismo de reparo de moléculas modificadas por EROs, estabelece uma reconstituição das estruturas biológicas danificadas (SIES, 1993; RAMEL; WAGNER; ELMADFA, 2004; TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003).

1.3. Derivação Liquórica

As primeiras derivações liquóricas utilizadas como tratamento foram marcadas por muitas complicações, como por exemplo, hiperdrenagem ou oclusão da extremidade distal (esta última é secundária à formação de corpo estranho, por reação ao material empregado nos sistemas de derivação) (DETWILER; PORTER; REKATE, 1999). A revolução na tecnologia das válvulas para hidrocefalia aconteceu com Holter, um técnico que, após ter conhecimento que seu filho nasceu com a anomalia, em poucas semanas projetou e construiu uma válvula de fenda de silicone que foi implantada por Spitz, em março de 1956. Esse mecanismo foi tão eficaz que sua produção começou no mesmo ano e, até hoje, as fabricações da maioria das modernas válvulas hidrocefálicas seguem basicamente o mesmo conceito: válvula antirrefluxo, por diferencial de pressão e confeccionadas com silicone (BOOCKVAR; LOUDON & SUTTON, 2001). Atualmente, o tratamento mais utilizado nos pacientes é a cirurgia de derivação liquórica, a qual o líquido é retirado do interior dos ventrículos cerebrais para o meio externo, através da derivação ventricular externa (DVE), para outras cavidades corporais, como o átrio direito (derivação átrio- ventricular), para a pleura (derivação ventrículo-pleural) (KUPELI; YILMAZ; AKÇAY, 2010), ou, sendo mais comum na prática clínica, para o peritônio (derivação ventrículo-peritoneal) (DADLANI et al., 2015). Além das derivações citadas, há também a terceiroventriculostomia endoscópica, um procedimento cirúrgico indicado para o tratamento da hidrocefalia obstrutiva, com objetivo de fazer uma abertura do assoalho do terceiro ventrículo, permitindo a saída do líquido cefalorraquidiano do sistema ventricular para o espaço subaracnóideo e, então, ser normalmente absorvido. A segurança e a rapidez da técnica, quando indicada, pode evitar a colocação da válvula (PEREIRA et al., 2002; AQUINO et al., 2018).

1.4. Hidrocefalia Experimental

A indução da hidrocefalia experimental vem sendo realizada há décadas, tendo-se utilizado no passado: algodão, sangue, glicerina e outras substâncias com objetivo de causar a obstrução em modelos animais. O caulim, um produto composto de silicato hidratado de alumínio, é o material que mais vem sendo utilizado para fins de pesquisa, por ser um modelo simples e de fácil acesso e ter um elevado índice de sucesso para a produção do bloqueio liquórico. A técnica causa uma inflamação nas meninges que irá obstruir a saída do quarto ventrículo, como acontece na hidrocefalia obstrutiva, impedindo o fluxo de LCR nos hemisférios cerebrais sem alterar as estruturas anatômicas envolvidas e sem precisar de cirurgia (CATALÃO et al., 2014; CARDOSO et al., 2011; DEFEO; MYERS; FOLTZ, 1979).

1.5. Neuroproteção e Edaravone

Neuroproteção pode ser definida como uma estratégia, ou conjunto de estratégias, que aplicada individualmente ou em combinação, de modo experimental ou in vivo, que antagonizem, interrompam ou retardem a sequência de eventos bioquímicos e moleculares lesivos, que possam gerar uma lesão isquêmica irreversível (GINSBERG, 2008). O estudo com neuroprotetores não é recente. A investigação dessa nova classe de drogas, a maioria antioxidante, iniciou-se a partir da melhor compreensão dos fenômenos bioquímicos envolvidos nas lesões do SNC. Qualquer estímulo ou trauma instalado, leva a alterações bioquímicas sensíveis no meio ambiente metabólico dos neurônios próximos àqueles inicialmente agredidos e, o emprego dessas drogas são capazes de regularizar esse ambiente ou aumentar a resistência neuronal, protegendo contra a degeneração celular dos neurônios (MARIGO; CRONEMBERGER; CALIXTO, 2001; LEVI; BRIMBLE, 2004).

O medicamento Edaravone, um forte removedor de radicais livres, desenvolvido pela Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation (Osaka, Japão), tem sido utilizado em muitas pesquisas por apresentar efeitos benéficos, destacando sua proteção neurovascular, tanto na parte laboratorial quanto na clínica (TANCHAROEN et al., 2013). O fármaco se apresenta em forma de pó branco cristalino, com um ponto de fusão de 129,7° C e é livremente solúvel em ácido acético, metanol ou etanol, e pouco solúvel em água e éter dietílico. Sua fórmula molecular é C₁₀H₁₀N₂O (figura

1), e o peso molecular é 174,20 (CRUZ, 2018).

Figura 1 – Fórmula estrutural do medicamento Edaravone

Figura 1: Fórmula estrutural do Edaravone. Fármaco constituído pela ligação 1-fenil, 3-metil, 5-pirazolona. O medicamento atua como doador de elétrons no estresse oxidativo e seu efeito terapêutico acontece devido às suas propriedades antioxidantes.

Fonte: Wikipedia, **EDARAVONE** – Disponível em:

<<https://en.wikipedia.org/wiki/Edaravone>> Acesso em: 12 março de 2020.

O Edaravone foi liberado no Japão em 2001 para pacientes com diagnóstico de acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) e, em 2015, para tratamento de esclerose lateral amiotrófica (ELA). No ano de 2017, o medicamento foi liberado também para o tratamento de ELA, porém, nos Estados Unidos (ROTHSTEIN, 2017). Embora não se saiba o mecanismo exato de ação no tratamento de ELA, seu efeito terapêutico pode acontecer devido às suas propriedades antioxidantes (CRUZ, 2018).

O medicamento inibe a reação radicalar através da inativação de uma variedade de EROs e ERN, interagindo bioquimicamente com uma vasta escala de radicais livres, doando elétrons principalmente na forma aniônica, ou hidrogênio, comprovando assim, sua eficácia como antioxidante (WATANABE; HAYASE, 1997; TABRIZCHI, 2000). Além disso, o Edaravone apresenta baixo peso molecular, o que o faz atravessar rapidamente a barreira hematoencefálica, indo além do compartimento vascular (KIKUCHI, 2011).

Outros aspectos importantes que podemos mencionar sobre o Edaravone é sua eficácia no tratamento da doença de Parkinson (XIONG et al., 2011), inibição e prevenção do edema cerebral após isquemia, na lesão tecidual, na morte neuronal, na lesão de células endoteliais vasculares, nos déficits neurológicos pós-lesão (YOSHIDA et al., 2006), entre outros.

Nosso grupo de pesquisa testou previamente a administração de Edaravone por 14 dias consecutivos na hidrocefalia experimental e nossos resultados apontaram efeito benéfico na morte celular por apoptose e uma diminuição importante na atividade astrocitária em ratos hidrocefálicos (GARCIA et al., 2016). Por este motivo, achamos de extrema importância testarmos se o medicamento mantém essa eficácia no grupo derivado.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Nem todos os pacientes com hidrocefalia podem ser submetidos ao tratamento cirúrgico com derivações liquóricas imediatamente após o diagnóstico, seja por apresentarem condições clínicas desfavoráveis, ou por apresentarem ainda dilatação ventricular inicial. Na tentativa de redução dos danos teciduais até o tratamento definitivo, ou mesmo para reforçar a recuperação completa após a instalação de um shunt, drogas neuroprotetoras estão sendo testadas.

Devido ao reconhecido poder antioxidante do Edaravone em diversas doenças justifica-se ser testado como droga neuroprotetora na hidrocefalia com e sem o uso da derivação liquórica.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi avaliar em ratos Wistar jovens hidrocefálicos o efeito neuroprotetor do medicamento Edaravone, juntamente com um sistema de derivação liquórica, através de:

- Testes comportamentais de campo aberto (open field) e labirinto aquático de Morris modificado (water maze).
- Avaliação histológica para análise da citoarquitetura geral (hematoxilina e eosina).
- Imunoistoquímica para quantificar astrócitos reativos (GFAP), análise das células em divisão mitótica (Ki-67) e avaliação da presença de células em apoptose (Caspase-3).
- Avaliação bioquímica por ELISA: quantificação de proteína (GFAP).

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos envolvendo os animais estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e aprovados pelo comitê local realizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) protocolo número: 133/2016 – 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 utilizados nesta pesquisa.

4.1. Animais

Foram utilizadas ninhadas de ratos machos da linhagem Wistar, 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. Cada ninhada foi constituída por uma rata-mãe e oito filhotes, 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, foram oferecidas água e dieta padrão de laboratório para roedores às mães *ad libitum*. Os filhotes em fase de desmame também tiveram acesso à dieta e à água.

4.2. Indução de hidrocefalia

Com sete dias de idade, os filhotes foram escolhidos aleatoriamente e submetidos à indução da hidrocefalia pelo método de injeção intracisternal de caulim ou mantidos sem intervenção para utilização como controle normal. Para indução da hidrocefalia, um auxiliar posicionou a cabeça do animal com uma mão e o corpo com a outra, flexionando o pescoço e deixando livre a região cervical dorsal. Através da palpação, foi identificado o espaço entre a margem posterior do forame magno, no osso occipital, e a borda cranial do arco dorsal da primeira vértebra cervical (figura 2). Com uma agulha odontológica Mise 0,3, de bisel curto, foi realizada a injeção percutânea lenta de 0,04 ml da suspensão de caulim (Merck®) a 15% de água destilada, esterilizada em autoclave. Após a injeção intracisternal os filhotes foram observados até completa recuperação e então recolocados em sua caixa alojamento de origem, retornando ao biotério.

Figura 2: Indução da hidrocefalia experimental

Figura 2: A) Indução da hidrocefalia. O auxiliar posiciona o rato e o pesquisador realiza a injeção percutânea na cisterna magna com a solução de caulim 15% (Merck®); **B)** Rato hidrocefálico com importante abaulamento da calota craniana em P14 (21 dias de vida).

Fonte: Acervo do laboratório de Proteção Cerebral na Infância (2016).

4.3. Formação dos grupos experimentais

Foram utilizados cinco grupos experimentais constituídos por 10 animais em cada, sendo:

- Controle (C): os animais não sofreram qualquer intervenção.
- Hidrocefálico Não Tratado (HNT): os animais foram submetidos à hidrocefalia por injeção intracisternal de caulim no 7º dia de vida.
- Hidrocefálico Tratado com Edaravone (HTE): os animais foram submetidos à hidrocefalia por injeção intracisternal de caulim no 7º dia de vida e receberam aplicação diária de Edaravone intraperitoneal (ip) a partir do 8º dia de vida.
- Hidrocefálico Tratado com Derivação (HTD): os animais foram submetidos à hidrocefalia por injeção intracisternal de caulim no 7º dia de vida, e derivados sete dias após.
- Hidrocefálico Tratado com Derivação e Edaravone (HTDE): os animais foram submetidos à hidrocefalia por injeção intracisternal de caulim no 7º dia de vida, receberam aplicação diária de Edaravone intraperitoneal (ip) a partir do 8º dia de

vida e derivados sete dias após a indução da hidrocefalia.

Todos os animais foram eutanasiados com 28 dias de vida (21 dias de hidrocefalia). Observados diariamente quanto a possíveis alterações clínicas (perda de peso e desidratação, alterações da marcha e da consciência, negligência com a higiene, entre outras). Caso fosse notada perda de peso acentuada, desidratação não recuperada após reidratação com injeção salina subcutânea, ou alterações neurológicas graves, o animal doente era eutanasiado por dose excessiva de anestésico e excluído do estudo.

4.4. Derivação liquórica ventrículo-subcutâneo (DVS)

No P07, equivalente ao 7º dia de hidrocefalia, ocorreu a verificação da macrocrania, logo após os ratos foram anestesiados via inalatória com Isoflurano (BioChimico®), e posicionados em decúbito ventral. Após administração de antibioticoterapia profilática (Cefalotina 50 mg/Kg, ip), tricotomia da cabeça, antissepsia da pele da cabeça e do dorso, utilizando uma solução de iodopolividona, e colocação de campos operatórios, uma pequena incisão foi realizada na cabeça, 3 mm à direita da linha média e 2 mm à frente a sutura coronal, envolvendo todos os planos do tegumento, para exposição óssea. A seguir, foi feito um orifício no crânio com 1mm de diâmetro com auxílio de um perfurador elétrico rotativo, com ponta delicada, seguido da cauterização. O ventrículo lateral direito foi puncionado com cateter de polipropileno de 0,7 mm de diâmetro e 8 mm de comprimento, angulado em 90°, conectado em um cateter de silicone (figura 3) que, após passagem pelo subcutâneo do pescoço, foi sepultado no subcutâneo do dorso, próximo à raiz da cauda. Para todo o procedimento cirúrgico (figura 4) foi utilizada técnica asséptica, com o sistema de derivação esterilizado em óxido de etileno e todos os materiais cirúrgicos esterilizados em autoclave. Após sutura da incisão cutânea, com mononylon 4.0 e recuperação anestésica, os animais retornaram à caixa-alojamento de origem (SANTOS et al., 2016).

Figura 3: Sistema de derivação ventrículo-subcutâneo

Figura 3: Sistema de derivação ventrículo-subcutâneo de polipropileno angulado a 90°, conectado a um cateter distal de silicone.

Fonte: Acervo do laboratório de Proteção Cerebral na Infância (2016).

Figura 4: Passos técnicos da cirurgia de derivação

Figura 4: Sequência dos passos técnicos da cirurgia de derivação ventrículo- subcutâneo: **A)** incisão da pele próxima a sutura coronal a direita, trepanação com perfurador elétrico rotativo no crânio e diêrese do subcutâneo do dorso; **B)** sistema de derivação inserido no subcutâneo do dorso e sepultado próximo à raiz da cauda; **C)** punção do ventrículo lateral direito com o cateter proximal angulado a 90°; **D)** síntese cirúrgica e finalização do procedimento.

Fonte: Acervo do laboratório de Proteção Cerebral na Infância (2016).

4.5. Administração do Edaravone

O medicamento Edaravone (MCI-186 sc-200806), adquirido sob a forma de pó, foi fracionado em porções de 0,002 mg e armazenado em eppendorfs de 1,5 ml. As soluções para o tratamento foram preparadas diariamente da seguinte forma: 0,002 mg de Edaravone, 0,7 ml de água e 0,3 ml de álcool 50%. Logo após o preparo, e antes da aplicação (20 mg/kg), a solução foi colocada em vórtex QL- 901 (Biomixer) para homogeneização. Depois de homogeneizada era feita a aplicação pela via intraperitoneal (figura 5). Esta preparação ocorria imediatamente no horário de administração da droga, e o volume remanescente não utilizado, era descartado.

Figura 5: Aplicação do medicamento Edaravone

Figura 5: Aplicação da injeção de 20mg/kg de Edaravone intraperitoneal no quadrante inferior esquerdo do abdômen a um ângulo entre 30 e 45°.

Fonte: Acervo do laboratório de Proteção Cerebral na Infância (2016). Administração de substâncias: Injeção Intraperitoneal – Boas Práticas em Experimentação Animal VPT FMVZ USP.

4.6. Estudos comportamentais

Os animais foram pesados diariamente e seu comportamento na caixa-alojamento avaliado de maneira individual (exploração do ambiente, mobilidade no espaço), e coletivamente na interação com os outros membros do grupo.

4.6.1. Teste de campo aberto (open field)

Para estudo do desenvolvimento sensório-motor, o comportamento deambulatório foi avaliado a cada dois dias pelo teste de campo aberto (open field) a partir do P06. Cada animal foi observado individualmente em uma arena de acrílico transparente de 60 cm de comprimento e 45 cm de altura, (figura 6) no tempo cronometrado de 2 minutos, sendo avaliados, cuidados com a higiene, exploração do ambiente e marcha, de acordo com a escala: 4 = alerta, com exploração e marcha normal; 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. As arenas foram limpas com solução de sabão neutro diluído em água entre as observações de diferentes ninhadas de animais.

Figura 6: Arena utilizada no teste de campo aberto (*open field*)

Figura 6: Arena para o teste de campo aberto. Os animais são observados através de uma arena de acrílico transparente durante 2 minutos e avaliados de acordo com a exploração geral na arena, a autolimpeza corporal e a qualidade da marcha.

Fonte: Acervo do laboratório de Proteção Cerebral na Infância (2017).

4.6.2. Labirinto aquático de Morris modificado (water maze)

Para o estudo da memória e aprendizagem espacial, os ratos foram submetidos ao teste com labirinto aquático de Morris modificado (water maze). O teste é composto por uma piscina circular (90 cm de diâmetro, 50 cm de altura) e uma plataforma transparente (28 cm de altura, 9,5 cm de diâmetro) posicionada 2 cm abaixo da superfície da água (figura 7). A temperatura da água da piscina foi controlada em aproximadamente 22°C a 24°C, sendo dividido em duas fases (adaptação e aprendizagem espacial). A fase de adaptação e treinamento foi realizada no dia correspondente ao 9º dia pós-indução da hidrocefalia (P09), no qual os ratos tiveram 60 segundos livres para nadar na piscina, sem a plataforma. A seguir, a plataforma era introduzida ao tanque, posicionada em um dos quatro quadrantes que o dividem. O treinamento foi realizado em quatro séries, sendo que em cada uma, o animal foi colocado na água voltado para um dos quatro pontos cardeais (esse cuidado deve ser tomado para que o filhote memorize a parede iluminada e a use como ponto de referência para localizar a plataforma camuflada sob a superfície da água, e não o encontro ao acaso da mesma pela natação livre em linha reta). A sala que abriga o tanque era totalmente escura, exceto por uma pequena fonte luminosa fixada próxima a um dos lados externos do tanque (norte), para que o animal identifique o ponto de referência a ser memorizado. O teste foi aplicado nos dias P10 e P14 pós-indução, em dois períodos (manhã e tarde). O tempo limite para o animal alcançar a plataforma e ser considerado um acerto é de 60 segundos. No final de cada sessão o animal era colocado na plataforma para descanso de 15 segundos e, em seguida, recolocado junto à parede da piscina, para iniciar uma nova sessão. Foi cronometrado o tempo gasto do ponto de partida até o encontro da plataforma de descanso. O tempo médio de cada turno diário foi calculado pela média do tempo gasto para o encontro da plataforma em cada uma das quatro sessões. Se o animal não encontrasse a plataforma até um tempo limite de 60 segundos, era colocado na plataforma para descanso de 30 segundos, e o tempo considerado para execução da tarefa foi de 60 segundos. No final do teste, o animal era seco com uma toalha macia e mantido em uma caixa aquecida, e então, recolocado junto com a mãe e os outros filhotes do grupo. Entre cada animal examinado, toda sujeira (dejetos sólidos e partículas da cama de maravalha) visível na água era retirada com o auxílio de uma peneira, deixando a arena limpa para um novo teste.

Figura 7: Piscina para teste – *water maze*

Figura 7: Piscina utilizada para realização do teste do Labirinto aquático de Morris modificado. **A)** Piscina vazia evidenciando a plataforma em acrílico; **B)** Piscina já cheia com o animal em cima da plataforma de descanso.

Fonte: Acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância (2017).

4.7. Perfusão cerebral e dissecação de estruturas

Ao final dos tempos experimentais, os animais de cada grupo foram profundamente anestesiados com isoflurano através da via inalatória. Após posicionamento na mesa cirúrgica, em decúbito dorsal, foi realizada uma ampla incisão em “Y” em cada animal, no tórax, das duas clavículas até o apêndice xifoide, e, no abdome, incisão mediana, xifo- púbica. Com uma agulha hipodérmica 25 x 0,8mm (21G x 1) foi introduzida na ponta do ventrículo esquerdo e canulada até a raiz da aorta, sendo iniciada a perfusão transcardíaca com solução salina, após uma pequena incisão na aurícula direita, até o clareamento do líquido de saída (cerca de 1 ml/g de peso do animal), com auxílio de uma bomba de perfusão peristáltica (Fisher Scientific). A seguir, os animais foram decapitados e seus encéfalos retirados em bloco, através de uma craniectomia de vértex. Imediatamente após sua retirada, cada encéfalo foi dividido no plano sagital. A metade esquerda foi então, acondicionada em tubo tipo eppendorf devidamente identificado, mergulhado em nitrogênio líquido para congelamento rápido e armazenada em ultrafreezer -80°C. Já a metade direita do encéfalo foi subdividida no plano coronal, em uma porção anterior e outra posterior, tomando-se como referencial o quiasma óptico, depois imersas em uma solução fixadora de paraformaldeído a 3% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3 – 7,4), por 24 horas à temperatura de 4°C, quando é trocada por uma solução de paraformaldeído 3% fresca, permanecendo nesta solução fixadora por mais sete dias à mesma

temperatura. As amostras de tecido congelado são posteriormente homogeneizadas em água bidestilada adicionada a um inibidor de proteinase (TRIS), em proporção constante para todas as amostras, aliquotadas, recongeladas em nitrogênio líquido e mantidas em *ultrafreezer* - 80°C para a realização da análise bioquímica.

4.8. Histoquímica e Imunoistoquímica

Os cortes das amostras foram desidratados em soluções crescentes de álcool (50% a 100%) diafanizados em xilol e emblocadas em parafina. Foram cortadas em plano coronal em um micrótomo rotativo em secções de 5µm de espessura e os cortes foram estendidos em lâminas histológicas.

Para análise por histoquímica, as lâminas foram mantidas em estufa (60°C) por uma hora para derretimento da parafina. A seguir, os cortes foram submetidos ao processo de desparafinização, seguidos de banhos sequenciais de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água; posteriormente, corados com hematoxilina e eosina (HE). Na coloração feita pelo método HE, foram observados a citoarquitetura geral, a distribuição das estruturas e a densidade celular.

Para o estudo imunoistoquímico, os cortes foram estendidos em lâminas histológicas silanizadas e mantidas em estufa a 60°C, por 30 minutos, e desparafinizadas em banhos sequenciais de xilol e álcool. Foram realizados estudos por imunoistoquímica para glial fibrillary acidic protein (GFAP), para avaliação da distribuição e aspecto morfológico da astroglia, Ki-67 para avaliação das células em divisão mitótica e Caspase-3 para avaliação da presença de células em apoptose.

Após a recuperação antigênica, quando indicado, pelo método de acidificação e aquecimento (citrato de sódio em panela de aquecimento), foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% em metanol. Posteriormente, feito o bloqueio com soro adequado a 10% em PBS, por 30 minutos em câmara úmida. Logo em seguida, os cortes foram incubados overnight à temperatura de 4°C com o anticorpo primário anti-GFAP (1:3000) (DAKO Z0334, Dinamarca) ou anti-Ki-67 (1:40) (Santa Cruz Biotechnology sc- 23900) ou anti-caspase 3 (1:25) (Santa Cruz Biotechnology sc-56053), conforme imunomarcacão desejada. Retirado o anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado (anticorpo biotinilado de cabra anti-coelho - Santa Cruz Biotechnology SC-2040 ou anti-mouse - Santa Cruz

Biotechnology SC-2039) diluído 1:300 em BSA. Após, foram incubados com o anticorpo terciário estreptavidina conjugada com HRP (BioLegend cat.405210) diluído 1:400 em PBS. A seguir, revelados com DAB (3'3'- diaminobenzidina - Sigma). Por fim, as lâminas foram 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®.

4.9. Quantificação de proteínas totais - Coomassie – Bradford

Eppendorfs de 1,5 ml foram preparados com soluções-padrão de albumina, encontrados na tabela 1:

Tabela 1: Valores de soluções padrão de albumina.

Tubo	Volume de solução de albumina (0,1 mg/ml)	Volume de H₂O	Concentração final de albumina
A	200 µl	300 µl	20 µg/ml
B	200 µl	300 µl	20 µg/ml
C	150 µl	350 µl	15 µg/ml
D	125 µl	375 µl	12,5 µg/ml
E	100 µl	400 µl	10 µg/ml
F	50 µl	450 µl	5 µg/ml
G	25 µl	475 µl	2,5 µg/ml
H	0 µl	500 µl	0 µg/ml

A seguir, foram feitas diluições das amostras homogeneizadas (previamente congeladas e armazenadas em -80°C). Com amostras e padrões preparados, 10 µl de cada tubo foram pipetados em microplaca de 96 poços, em triplicata. A cada poço foi adicionado 300 µl do reagente Coomassie (Cód: 23236 - Thermo Fischer Scientific, Massachussets, EUA) e a placa foi agitada por 30 seg. A placa foi, então, incubada em temperatura ambiente por 10 min e lida em leitora de microplacas a 595 nm. A medida obtida do padrão foi subtraída das medidas dos demais poços. Os valores obtidos para as amostras são corrigidos para as diluições realizadas (Bradford, 1976).

4.10. Quantificação de proteínas pelo método bioquímico ELISA

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras determinadas foi utilizado o método bioquímico ELISA (enzyme linked immunosorbent assay / ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima) em uma placa de 96 poços para titulação da proteína GFAP. Cada ensaio começou com a cobertura de uma placa de 96 poços com 100ul/poço de uma solução de anticorpo policlonal contra a proteína a ser quantificada, na concentração de 1ug/ml em PBS, “overnight” em geladeira a 5°C. No dia seguinte, a placa foi lavada na lavadora automática, por 4 vezes com PBS. A seguir, foi realizado o bloqueio com 100ul/poço uma solução a 5% de leite desnatado em PBST (0,5% de Triton em PBS). Após 1 hora, a placa foi lavada por 4 vezes com PBST. Em seguida foi aplicado 100ul/poço do padrão da proteína a ser dosada diluída em PBST, em diluições conhecidas (ex. 0, 1, 15, 25, 50, 75, 100 e 125 ng/ml), em triplicata. Também em triplicata, foram aplicadas as amostras diluídas em PBST (100ul/poço), nos poços remanescentes. Após 1 hora de incubação, a placa foi novamente lavada em lavadora por quatro vezes com PBST e, a seguir, foi aplicada, em todos os poços, uma solução de anticorpo monoclonal contra a proteína a ser quantificada (100ul/poço), diluída em concentração previamente testada (ex.: 1:5000) em leite desnatado a 5% em PBST. Depois de 1 hora, a placa foi novamente lavada com PBST, por 4 vezes, e 100ul/poço de uma solução de anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (contra o hospedeiro do segundo anticorpo primário aplicado), também diluído em leite desnatado a 5% em PBST, na concentração de 0,5ug/ml foi aplicada em todos os poços. Novamente a placa foi lavada por 4 vezes com PBST, após 1 hora de incubação.

A seguir, foi aplicado 100ul/poço do substrato de fosfatase, preparado de acordo com as instruções do fabricante (Pierce). A placa foi, então, mantida em local escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, foi aplicada 50ul/poço de uma solução 2N de NaOH para parar a reação, e a placa foi, imediatamente após, lida em leitora automática de placas, no comprimento de 405nm.

Os valores encontrados foram corrigidos de acordo com a concentração de proteínas totais, previamente quantificadas para cada amostra, pelo ensaio de BCA (bicinchonic acid - Pierce). A notação, portanto, foi de x mg de proteína específica (ex: GFAP / proteínas totais).

4.11. Documentação fotográfica

Para documentação fotográfica das lâminas e contagem de células, foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse E200MV com sistema de captura de imagens digital (MOTICAN 10), com software dedicado em ambiente Windows MOTIC images plus 2.0, instalado no Laboratório de Proteção Cerebral na Infância da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto –USP. Para as ilustrações da tese 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 do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Para as lâminas coradas com HE foram fotografadas a região do corpo caloso (CC) e matriz germinativa em objetiva de 40x.

Nas lâminas imunomarcadas com GFAP foram fotografadas as regiões do corpo caloso e da matriz germinativa (objetiva de 40x), onde foi realizada a contagem dos astrócitos reativos e a classificação da reação astrogial através de um escore de 0 a 2, sendo 0: ausência de astrócitos reativos; 1: astrócitos reativos com prolongamentos finos e delicados e 2: astrócitos reativos com prolongamentos grossos. As lâminas imunomarcadas com Ki-67 foram fotografadas (objetiva de 40x) apenas na região da matriz germinativa (área de intensa proliferação celular), onde foi realizada a contagem das células marcadas em divisão mitótica. Já as lâminas imunomarcadas com caspase-3 foram fotografadas (objetiva de 40X) na região do córtex dorsal ao ventrículo lateral e foi feita a contagem das células imunomarcadas em processo de apoptose.

4.12. Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Os dados foram apresentados como médias (ou mediana). Para dados paramétricos foi utilizada 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 de pós-teste de Dunn. As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Peso Corporal

De acordo com o gráfico de ganho progressivo do peso corporal (figura 8), antes da indução de hidrocefalia, o peso inicial dos animais era semelhante em ambos os grupos ($\pm 19,26$ g). O grupo C, apesar de ter iniciado o experimento com o peso médio mais baixo (15,66 g), foi o que conseguiu ganhar mais peso até o final do experimento, alcançando a média de 113,16 g no P21, mas foi em P16 que começou a se destacar dos demais grupos.

Dentre os grupos hidrocefálicos tratados, o grupo HTE iniciou o experimento com a maior média de peso (23,00 g), permaneceu com ganho progressivo até o final do experimento e alcançou a média ponderal de 102,57 g no P21, ficando atrás apenas do grupo controle. Os animais do grupo HTD iniciaram o experimento com peso médio de 20,25 g e, em P9, P10, P11 e P14 foi o grupo que mais se destacou no ganho de peso (38,00 g, 41,83 g, 43,60 g e 57,42 g, respectivamente). Em P20, o grupo HTD apresentou perda de peso (de 89,00 g para 84,50 g), fazendo com que caísse de posição no ranking de ganho de peso. No último dia de experimento o grupo apresentou peso médio de 92,00 g, sendo a quarta maior média depois dos grupos C, HTE e HNT. O grupo HTDE iniciou o experimento com média de peso de 20,57 g. Em P8, um dia após o procedimento cirúrgico, os animais apresentaram o peso médio mais baixo dentre os grupos (29,00 g), permanecendo com este menor ganho de peso até o último dia do experimento (74,00 g), exceto em P14, que o grupo HNT teve o peso médio mais baixo entre eles (44,80 g).

Os animais hidrocefálicos sem tratamento começaram o experimento com peso médio baixo em relação aos outros grupos hidrocefálicos (16,83 g). Entre P2 e P7 permaneceu com a menor média de peso quando comparado aos demais grupos, porém, a partir de P8, o grupo HNT começou a ganhar mais peso conforme o passar dos dias. Entre P15 até P20 registrou a quarta maior média de peso entre os grupos (de 53,00 a 78,33 g) e, em P21, subiu para a terceira colocação após a queda no ganho de peso do grupo HTD, fechando o período experimental com peso médio de 99,60 g.

Figura 8: Gráfico com o ganho ponderal progressivo de peso dos animais durante os 21 dias de experimento

Figura 8: Progressão linear do ganho de peso durante o experimento. C: controle; HNT: hidrocefálico não tratado; HTD: hidrocefálico tratado com derivação; HTE: hidrocefálico tratado com Edaravone; HTDE: hidrocefálico tratado com derivação e Edaravone. Em P21, o grupo C registrou a maior média de peso corporal, seguido pelos grupos HTE e HNT. O grupo HTD alcançou a maior média em P9, P10, P11 e P14, porém, uma queda na progressão em P20 fez com que o peso médio deste grupo permanecesse inferior aos grupos C, HTE e HNT na última pesagem. O grupo HTDE finalizou o período experimental com o menor ganho de peso.

A avaliação estatística referente ao peso corporal geral (figura 9) nos mostra que não foram encontradas diferenças entre os grupos ($p=0.68$). A média geral de peso registrada aponta que o grupo HTE ($49,69 \text{ g} \pm 5,35$) e o grupo C ($48,76 \text{ g} \pm 6,25$) ficaram próximos entre si e foram os grupos que mais ganharam peso durante o experimento. O grupo HTD finalizou o período experimental com a terceira maior média de ganho peso ($47,31 \text{ g} \pm 5,00$). A seguir, observamos que o grupo HNT que registrou média de $42,47 \text{ g} \pm 5,22$ e, com a menor média de peso encontrada, o grupo HTDE com $40,03 \text{ g} \pm 3,72$.

Figura 9: Gráfico da média geral do ganho de peso dos animais

Figura 9: Gráfico da média geral do ganho de peso durante os 21 dias de experimento. Os grupos que apresentaram as maiores médias foram: HTE ($49,69 \text{ g} \pm 5,35$), C ($48,76 \text{ g} \pm 6,25$) e HTD ($47,31 \text{ g} \pm 5,00$), seguido pelo grupo HNT ($42,47 \text{ g} \pm 5,22$). Já os animais do grupo HTDE ($40,03 \text{ g} \pm 3,72$) foram os que apresentaram a pior média no ganho de peso, porém não foram observadas diferenças significativas.

5.2. Teste de campo aberto (open field)

No teste de campo aberto podemos observar que, em P6 os animais dos cinco grupos receberam notas entre 1 e 2 do escore. O grupo HTDE pode ser destacado dos demais pois apresentou o escore médio mais próximo da nota 2 (1,9), ou seja, os animais conseguiam se movimentar mais na arena, mesmo quando apresentavam marcha ligeiramente instável. Os animais dos outros grupos pouco se movimentavam na arena, alguns apresentavam curvatura cifótica, marcha anormal e dificuldade para fazer a passada, podendo apresentar também base alargada, instável ou atáxica. Os

animais do grupo HTE receberam a menor média do escore nesse dia de teste (1,3).

Em P8 observamos que todos os grupos obtiveram uma melhor média no escore quando comparado com a primeira avaliação. O grupo C e HTDE se destacaram dos demais com média mais próxima a nota 3 (2,7 e 2,6, respectivamente). As piores notas nesse dia de teste foram para os grupos HTE e HNT, ambos com média 2,0 no escore. Estes grupos apresentavam maiores déficits na marcha (base de apoio mais alargada e instabilidade/ataxia) e acentuada curvatura da coluna vertebral.

No teste realizado em P12, todos os grupos novamente melhoraram suas notas médias. O grupo C apresentou a maior média no teste: 3,6, seguido do grupo HTDE (3,3) e HTD (3,0), grupos estes que tinham alguma redução dos movimentos, mas já apresentavam marcha com padrão mais próximo do normal. Já os grupos HTE (com nota média de 2,9) e HNT (com média de 2,5 no escore) ainda apresentavam um padrão de marcha mais instável nesta avaliação.

A partir de P14, os animais do grupo C começaram a receber a nota máxima do escore (4), pois exploravam toda a arena movimentando-se com rapidez (exploração horizontal) e subiam nas laterais da arena (exploração vertical). Os animais também já andavam com as quatro patas apoiadas no chão e demonstravam comportamentos naturais com mais frequência (grooming - limpeza corporal e farejamento). Já os animais do grupo HNT, obtiveram pouca progressão quando comparamos com a última avaliação (escore médio de 2,6). Os animais eram menos ativos e atentos, possuíam exploração horizontal e vertical reduzida, andavam em círculos e nas pontas dos pés, o que mantém a característica de instabilidade na marcha. Já os grupos HTD, HTE e HTDE apresentaram melhora em seus escores (3,5, 3,2 e 3,8, respectivamente), ou seja, alguns animais ainda apresentavam redução nos movimentos, mas o padrão da marcha já estava mais semelhante ao considerado normal.

Em P16 não foram observadas grandes mudanças em relação à avaliação anterior. Os animais HNT e C continuaram com a mesma média de nota de P14 e os grupos HTD, HTE e HTDE, mostraram mínima melhora (3,6, 3,5 e 3,9, respectivamente).

Em P18, os animais HNT tiveram uma pequena melhora da nota em relação ao teste anterior (2,8), porém, ainda apresentavam marcha com padrão anormal. Os animais do grupo HTDE conseguiram alcançar o escore 4 e se igualaram aos animais

controles, possuíam maior capacidade exploratória, movimentando-se com rapidez e demonstravam comportamentos naturais, como de luta e autolimpeza corporal com maior frequência.

Já os animais dos grupos HTD e HTE também apresentaram melhora na média de seus escores (3,9 e 3,7, respectivamente), ou seja, observamos que alguns animais permaneceram com redução dos movimentos e alguns conseguiram aprimorar o padrão de marcha.

No último dia do teste (P20), o grupo HNT se manteve com a mesma média da avaliação anterior, os animais ainda apresentavam padrão de marcha instável, com base alargada e atividade reduzida. Os animais do grupo HTD também permaneceram com a mesma média do escore da avaliação anterior, ou seja, não observamos progresso nesta etapa. O grupo HTE aumentou seu escore médio para 3,9 e se equiparou aos grupos C e HTDE que permaneceram até o final do experimento com o escore máximo (4).

O gráfico de progressão do escore médio da primeira até a última avaliação no teste de campo aberto pode ser observado na figura 10. É possível observar que, no geral, todos os grupos conseguiram alcançar notas melhores, exceto o grupo HNT, com o pior desempenho no teste.

Figura 10: Gráfico de desempenho no teste de *open field*.

Figura 10: Desempenho dos animais no teste open field. A partir de P12 os animais dos grupos C e HTDE já começaram a se destacar e alcançaram médias próximas ao escore máximo do teste (nota 4). Em P18 alcançaram o escore quatro e se mantiveram com esta nota até a última avaliação. Os grupos HTD e HTE também melhoraram suas notas de forma progressiva e alcançaram escore médio de 3,9 em P20. Já os animais do grupo HNT permaneceram durante todo o experimento com o pior desempenho e em P20 registrou escore médio de 2,8.

Na avaliação estatística, podemos visualizar no gráfico (figura 11) a comparação da média geral obtida por cada grupo. Os grupos apresentaram as seguintes médias $\pm$ erro padrão: C= $3,4 \pm 0,36$; HTDE= $3,4 \pm 0,30$ (os dois grupos com o melhor desempenho durante o experimento); HTD= $3,1 \pm 0,31$; HTE= $2,9 \pm 0,36$ e HNT= $2,4 \pm 0,18$, com o pior desempenho no teste. Apesar dos melhores resultados dos grupos C e HTDE em relação aos demais grupos, não foram observadas diferenças significativas ($p=0,08$).

Figura 11: Gráfico de comparação das médias no teste open field

Figura 11: Gráfico de comparação das médias obtidas em cada grupo no teste de open field. Apesar de não haver diferenças significativas entre os grupos, os animais C ($3,4 \pm 0,36$) e HTDE ($3,4 \pm 0,30$) apresentaram melhor desempenho, vindo em seguida os grupos HTD ($3,1 \pm 0,31$) e HTE ($2,9 \pm 0,36$). Os animais HNT ($2,4 \pm 0,18$) foram os que mostraram o pior desempenho no teste.

5.3. Labirinto aquático de Morris modificado (water maze)

No primeiro dia de teste (P10), realizado no período da manhã, os animais HTE ($47,75 \text{ s} \pm 5,59$) e C ($49,43 \text{ s} \pm 3,03$), encontraram a plataforma com um tempo reduzido em relação aos demais grupos experimentais. Os animais HTD ($51,96 \text{ s} \pm 3,78$) e HNT ($52,64 \text{ s} \pm 2,66$) foram os grupos que encontraram a plataforma na sequência. Já os animais do grupo HTDE foram os que mais demoraram para encontrar a plataforma submersa ($57,46 \text{ s} \pm 0,94$). Não foram registradas diferenças significativas ($p=0,41$).

No mesmo dia (P10), no período da tarde, todos os grupos encurtaram o tempo para encontrar a plataforma em relação ao teste da manhã, sendo: HTD= $42,64 \text{ s} \pm 3,01$, HTE= $46,76 \text{ s} \pm 5,95$, C= $47,67 \text{ s} \pm 2,74$, HTDE= $49,87 \text{ s} \pm 4,44$ e HNT= $50,89 \text{ s} \pm 4,19$. Com base nestes dados, podemos afirmar que os grupos HTD e HTDE conseguiram diminuir em $\pm$ oito segundos o tempo para encontrar a plataforma do período da manhã para o período da tarde, porém, não foram observadas diferenças significativas ($p=0,68$).

No segundo dia de teste (P14), no período da manhã, os animais HTE ($42,89$

s $\pm$ 5,20), HTDE (45,84 s $\pm$ 4,49) e C (48,40 s $\pm$ 3,68), encontraram a plataforma mais rápido que os demais grupos. É válido ressaltar que, nesta etapa, os animais hidrocefálicos associados ao tratamento com Edaravone, conseguiram alcançar a plataforma submersa mais rapidamente que os animais controles, apesar de não haver diferença significativa. Os animais do grupo HNT demoraram um segundo a mais para encontrar a plataforma submersa em comparação com o teste da tarde na avaliação anterior (51,91 s $\pm$ 2,83). Já os animais HTD apresentaram uma piora no tempo para alcançar a plataforma (52,47 s $\pm$ 3,77), 10 segundos a mais do que na última avaliação, porém, sem diferenças significativas ($p=0,29$).

Por fim, no teste realizado no período da tarde em P14, observamos que os animais controles conseguiram ser $\pm$ 12 segundos mais ágeis para encontrar a plataforma submersa em relação ao período da manhã (36,68 s $\pm$ 4,97). Os animais do grupo HTD mostraram redução de $\pm$ 14 segundos para encontrar a plataforma (38,18 s $\pm$ 2,29) e o grupo HTE completou o teste com média de 41,39 s $\pm$ 5,17, um segundo a menos que no teste anterior. O grupo HNT reduziu o seu tempo para 44,25 s $\pm$ 4,63 e o grupo HTDE demorou um segundo a mais para finalizar o teste (46,79 s $\pm$ 2,22). Não foram encontradas diferenças significativas ($p=0,39$).

Em resumo, considerando a primeira avaliação e a comparando com a última, observamos que os grupos C e HTD reduziram o tempo para encontrar a plataforma submersa em média 13 segundos. A seguir, o grupo HTDE reduziu seu tempo em 11 segundos. O grupo HNT conseguiu diminuir seu tempo para oito segundos e o grupo HTE apenas seis segundos.

O gráfico de progressão de desempenho pode ser observado na figura 12 e as avaliações estatísticas podem ser observadas na figura 13.

Figura 12: Gráfico de desempenho no teste water maze

Figura 12: Gráfico de progressão linear do desempenho no teste water maze. Em P10, no período da manhã, os animais do grupo HTE encontraram a plataforma com mais rapidez e os animais do grupo HTDE demoraram mais para encontrá-la. No período da tarde, todos os grupos melhoraram o desempenho, destaque para o grupo HTD. Em P14, no período da manhã, os grupos HTE e HTDE se destacaram e foram mais rápidos para encontrar a plataforma submersa, já os ratos dos grupos C, HNT e HTD, foram os mais lentos. No período da tarde, os animais dos grupos C, HTD e HTE encontraram a plataforma com maior rapidez e, com o pior tempo registrado, encontram-se os grupos HNT e HTDE.

Figura 13: Gráfico de desempenho por grupo no teste *water maze*

Figura 13: Gráficos com as médias dos tempos obtidos no teste *water maze*. Em P10 os animais encontravam a plataforma com tempos similares. O grupo HTE se destacou no período da manhã e o grupo HTD foi o mais ágil no período da tarde. Em P14, manhã, os animais C, HTE e HTDE foram os mais rápidos para encontrar a plataforma submersa. Já no período da tarde, os piores tempos registrados foram dos grupos HNT e HTDE. Diferenças estatísticas não foram encontradas em nenhum dia de teste.

5.4. Avaliação Histológica

5.4.1. Coloração com hematoxilina e eosina

De acordo com as fotomicrografias (figura 14), podemos observar que o CC dos animais do grupo C mostrou-se com fibras íntegras, contínuas, alinhadas, sem espaçamento e sem sinais de edema. No epêndima, observa-se que a camada se manteve contínua e sem desnudamento endimário.

Os grupos hidrocefálicos apresentaram dilatação ventricular e algumas particularidades foram observadas em cada grupo:

O corpo caloso do grupo HNT apresentou-se comprimido e estirado, com sinais de edema visto pelo espaçamento ou esgarçamento entre suas fibras. Nos casos mais graves de hidrocefalia, o CC estava completamente destruído. Os ventrículos laterais se encontravam dilatados e apresentavam presença de pontos de rotura com áreas de desnudamento na camada endimária. Nos locais onde o epêndima ainda estava presente, as células eram achatadas, comprimidas e estiradas.

O CC dos animais do grupo HTD, assim como o grupo C, não apresentaram espaçamento entre as fibras e tiveram seu epitélio um pouco mais conservado. A camada endimária apresenta pontos de descontinuidade.

Já os animais do grupo HTE, apesar de apresentar o CC com alguns sinais de edema e espaçamento entre as fibras, a camada endimária apresentava-se contínua, alinhada e mais preservada, com o epitélio cúbico simples com núcleos mais centralizados.

Os animais HTDE também apresentaram alguns sinais de edema no CC e células com aparência picnótica. A camada endimária aparentava-se com mais células e alinhamento preservados.

Figura 14: Avaliação histológica por hematoxilina e eosina – CC

Figura 14: Fotomicrografias da avaliação histológica (HE) do CC. Os grupos C e HTD mostraram-se bem celularizados, com camada ependimária contínua, alinhada e preservada. Os animais HTE e HTDE, possuíam o CC com alguns sinais de edema, pouco espaçamento entre as fibras e camada ependimária mais conservada. Já o CC do grupo HNT apresentava-se comprimido e estirado, com sinais de edema e esgarçamento (*), grande dilatação ventricular e desnudamento na camada ependimária (seta). VL = Ventrículo lateral. Objetiva de 40x. Barra de 20µm.

A região da matriz germinativa (figura 15) localizada no ângulo externo dos ventrículos laterais, apresenta-se nos animais dos grupos C e HTD, intensamente celular, com epitélio e núcleos celulares preservados.

Nos animais do grupo HNT, a matriz germinativa perdeu grande parte de suas células, e em alguns animais, observamos estar praticamente sem. O epitélio apresentou-se rompido e com fibras edemaciadas.

No grupo HTE, observa-se uma ligeira preservação das células, apesar de apresentar vários pontos com edemas e leve espaçamento entre as fibras. E no grupo HTDE, é possível observar menor presença de células e desnudamento na região do epêndima, porém sem sinais de edema.

Figura 15: Avaliação histológica por hematoxilina e eosina – MG

Figura 15: Fotomicrografias da avaliação histológica (HE) na MG. Os animais C e HTD apresentaram a MG com intensa celularidade, epitélio e núcleos celulares preservados. Nos animais HTE, observamos uma ligeira preservação das células, apesar de apresentar pontos com edema (*). Nos grupos HNT e HTDE a matriz germinativa perdeu grande parte de suas células, o epêndima apresentou-se descontínuo (seta) e com células edemaciadas (círculo). VL: Ventrículo lateral. Objetiva de 40x. Barra de 20µm.

5.5. Avaliação imunoistoquímica

5.5.1. GFAP

Os astrócitos de repouso apresentam, morfologicamente, um conjunto de corpos celulares pequenos com prolongamentos finos e são altamente ramificados, enquanto os astrócitos reativos possuem um corpo celular maior, com prolongamentos grossos e coloração escura. As estruturas mais acometidas e intensamente marcadas em nossa análise foram: o corpo caloso e a região da matriz germinativa, no ângulo externo do ventrículo lateral. Concentramos assim, a atenção para essas regiões afetadas pela hidrocefalia.

Na figura 16, podemos analisar o número de astrócitos reativos encontrados por mm² na região corpo caloso e, também a média do escore obtido por grupo. Os animais dos grupos HNT ($18,43 \pm 0,42$) e HTDE ($12,86 \pm 3,38$) foram os que apresentaram maior número de astrócitos reativos por mm². Os grupos HTD ($8,57 \pm 1,11$) e HTE ($8,00 \pm 1,25$) apresentavam imunomarcacão semelhante entre si, com poucos astrócitos marcados. Já os animais do grupo C ($3,71 \pm 0,42$) exibiram leve reação astrocitária por mm², seus prolongamentos eram delicados e pouco visíveis, característica comum de astrócitos de repouso (16-A). Diferenças significativas foram encontradas apenas entre os grupos C x HNT e C x HTDE ($p < 0,05$). Ao aplicarmos o escore de intensidade de marcação na região do CC (16-B), observamos que os animais dos grupos C ($0,28 \pm 0,18$) e HTE ($0,57 \pm 0,29$), receberam menor nota no escore, o que indica que a marcação astrocitária era mais tênue em relação aos demais grupos. Não muito diferente, o grupo HTDE apresentou escore médio de marcação de $0,85 \pm 0,34$, ou seja, mesmo sendo um grupo com maior quantidade de astrócitos por mm², estas células se apresentaram com características mais próximas de astrócitos de repouso. O grupo HTD apresentou escore médio de $1,28 \pm 0,18$, o que implica que os astrócitos deste grupo estavam mais reativos que os dos demais grupos hidrocefálicos. Já o grupo HNT ($2,00 \pm 0,00$) foi o que recebeu a maior nota, pois suas características eram típicas de astrócitos reativos. Encontramos diferença significativa entre os grupos C x HNT e HNT x HTE ($p < 0,05$). As fotomicrografias da região do corpo caloso podem ser observadas na figura 17.

Figura 16: Gráfico da avaliação imunoistoquímica - GFAP – CC

Figura 16: A: Gráfico de densidade da reação astrocitária no CC. Observamos que os grupos HNT e HTDE possuíam maior nº de astrócitos reativos por mm² com diferenças significativas entre: C x HNT e C x HTDE ($p < 0,05$). B: Gráfico da categorização por escore das lâminas imunomarcadas para GFAP no CC. Os grupos C e HTE apresentaram astrócitos finos, delicados e as vezes pouco perceptíveis, vindo em seguida os grupos HTDE e HTD, enquanto os animais HNT, tinham seus astrócitos grandes, escuros e altamente ramificados. Diferenças significativas foram encontradas entre os grupos C x HNT e HNT x HTE ($p < 0,05$).

Figura 17: Fotomicrografias da avaliação imunoistoquímica – GFAP – CC

Figura 17: Fotomicrografias da imunomarcacão por GFAP no CC. Os animais dos grupos C e HTE apresentaram marcação astrocitária mais tênue em relação aos demais grupos. O grupo HTDE, mesmo com maior quantidade dentre os grupos tratados, apresentou astrócitos com características de repouso (*): finos, mais claros e pouco ramificados. No grupo HTD, apesar de estarem em menor número, os astrócitos presentes estavam mais reativos (seta) que os dos demais grupos hidrocefálicos tratados. Já o grupo HNT continha características típicas de astrócitos reativos, com prolongamentos grossos e altamente ramificados. VL= Ventrículo lateral. Objetiva de 40x. Barra de 20µm.

Nas figuras 18 e 19, podemos analisar o número de astrócitos reativos por mm², o escore obtido após avaliação do aspecto morfológico da astrógia e as fotomicrografias das lâminas imunomarcadas na região da matriz germinativa.

Os grupos C ($4,42 \pm 0,84$), HTE ($8,42 \pm 1,06$) e HTDE ($9,71 \pm 1,87$) obtiveram menor reação astrocitária por mm², enquanto os grupos HNT ($23,00 \pm 4,24$) e HTD ($16,43 \pm 2,84$), apresentaram maior número de astrócitos reativos (figura 18-A). Na comparação entre eles, verificou-se diferença significativa entre os grupos C x HNT, C x HTD, HNT x HTE e HNT x HTDE ($p < 0,05$). Na categorização por escore (figura 18-B), observamos que os grupos C ($0,28 \pm 0,18$), HTE ($0,42 \pm 0,29$) e HTDE ($0,57 \pm 0,20$), apresentaram um escore mínimo, e consequentemente receberam menor nota em relação aos outros dois grupos hidrocefálicos: HNT ($1,85 \pm 0,14$) e HTD ($1,71 \pm 0,18$), que estavam com maior reação astrocitária. Apresentando diferenças significativas entre os grupos C x HNT, C x HTD, HTD x HTE e HTD x HTDE ($p < 0,05$).

Figura 18: Gráfico da avaliação imunoistoquímica – GFAP – MG

Figura 18: A) Gráfico de densidade da reação astrocitária na região da MG. Os grupos C, HTE e HTDE obtiveram menor reação astrocitária, enquanto os grupos HNT e HTD, apresentaram maior número de astrócitos reativos. Verificou-se diferença significativa entre os grupos C x HNT, C x HTD, HNT x HTE, HNT x HTDE ($p < 0,05$). **B)** Gráfico da categorização por escore das lâminas imunomarcadas para GFAP na região da MG. Os grupos C, HTE e HTDE apresentaram um escore mínimo em relação aos outros dois grupos hidrocefálicos, com diferenças significativas entre os grupos C x HNT, C x HTD, HTD x HTE e HTD x HTDE ($p < 0,05$).

Figura 19: Fotomicrografias da avaliação imunoistoquímica – GFAP - MG

Figura 19: Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP na matriz germinativa. Os grupos C, HTE e HTDE apresentaram astrócitos mais finos e delicados, de repouso (*). Já os grupos HNT e HTD apresentaram astrócitos reativos (setas) com prolongamentos grossos e altamente ramificados. VL= Ventrículo lateral. Objetiva de 40x. Barra de 20 µm.

5.5.2. Ki-67

Na análise das células em divisão mitótica marcadas, na região da matriz germinativa (no ângulo externo do ventrículo lateral), observamos que os animais do grupo controle ($30,29 \pm 5,17$) eram intensamente celulares, possuíam células pequenas (de núcleo basofílico em azul intenso) e com grande número de células marcadas pelo anticorpo Ki-67. Analisando o grupo HNT ($4,28 \pm 1,84$), verificamos que a matriz germinativa era menos povoada de células, com número de células marcadas muito reduzido em relação aos controles e com diferença significativa de $p < 0,05$ (figura 20).

Os grupos que receberam tratamento: HTE ($12,14 \pm 4,63$), HTD ($17,71 \pm 2,62$) e HTDE ($18,57 \pm 3,13$), apesar de não terem apresentado diferença significativa, é possível observar no gráfico que a população celular era maior quando comparado ao grupo HNT (figura 21).

Figura 20: Gráfico da avaliação imunoistoquímica – Ki-67 – MG

Figura 20: Análise das células em divisão mitótica na matriz germinativa pela imunomarcagem por Ki-67. Os animais do grupo C possuíam grande número de células imunomarcadas. Os grupos HTE, HTD e HTDE apresentaram maior imunomarcagem quando comparados ao grupo HNT que se mostrou com matriz germinativa menos povoada de células e com imunomarcagem muito reduzida em relação aos demais grupos. Diferença significativa foi encontrada entre os grupos C x HNT ($p < 0,05$).

Figura 21: Fotomicrografias da avaliação imunoistoquímica – Ki-67 – MG

Figura 21: Fotomicrografias de lâminas imunomarcadas com Ki-67 na região da matriz germinativa. O grupo C apresentou grande imunomarcção por Ki-67, o que sugere grande atividade mitótica. Dos grupos que receberam tratamento (HTE, HTD e HTDE), a população celular se encontrava maior quando comparado ao grupo HNT, que possuía a matriz germinativa com baixa celularidade e que estava muito reduzida em relação aos controles. As flechas apontam algumas das células imunomarcadas. Objetiva de 40x. Barra de 20µm.

5.5.3. Caspase-3

Na análise do córtex cerebral pela imunomarcção por caspase-3, podemos observar que os animais HTE ($15,96 \pm 2,16$) e HTDE ($14,4 \pm 1,95$) quando comparados aos outros dois grupos hidrocefálicos, HNT ($31,56 \pm 1,61$) e HTD ($29,4 \pm 2,03$) apresentaram menos células em apoptose, ficando mais próximos ao grupo C ($11 \pm 1,19$). O gráfico da figura 22 mostra as diferenças significativas encontradas entre os grupos C x HNT, C x HTD, HNT x HTE, HNT x HTDE, HTD X HTE e HTD x HTDE ($p < 0,05$).

Nas fotomicrografias podemos confirmar que os grupos C, HTE e HTDE apresentavam menos células imunomarcadas, quando comparados com os outros dois grupos HNT e HTD (figura 23).

Figura 22: Gráfico da avaliação imunoistoquímica – Caspase-3

Figura 22: Análise do córtex cerebral para imunomarcção de caspase-3. Os animais C, HTE e HTDE apresentaram número reduzido de células em apoptose. Os grupos HNT e HTD, ao contrário, apresentaram alta expressão de caspase-3. Diferenças estatísticas foram encontradas entre os grupos C x HNT, C x HTD, HNT x HTE, HNT x HTDE, HTD X HTE e HTD x HTDE ($p < 0,05$).

Figura 23: Fotomicrografias da avaliação imunoistoquímica – Caspase-3

Figura 23: Fotomicrografias de lâminas imunomarcadas para caspase-3 na região do córtex cerebral. Os grupos C, HTE e HTDE apresentaram poucas células imunomarcadas. Já os grupos HTD e HNT encontravam-se fortemente imunomarcados (setas). Objetiva de 40x. Barra de 20µm.

5.6. Análise bioquímica – GFAP

No gráfico da análise bioquímica através do método ELISA (figura 24), podemos observar alta concentração de GFAP (mg/ g de tecido nervoso), com maior reação astrogliar no grupo HTD ($8,46 \pm 0,53$), seguido pelos grupos HNT ($6,85 \pm 0,50$) e C ($6,45 \pm 1,32$). Já os animais do grupo tratado com Edaravone e os tratados com Edaravone associado à derivação foram os que apresentaram menor concentração de GFAP: HTE ($5,37 \pm 0,61$) e HTDE ($5,22 \pm 0,39$). Diferenças significativas foram encontradas entre os grupos HTD X HTE ($p=0,008$) e HTD X HTDE ($p=0,01$).

Figura 24: Análise da concentração de GFAP (mg/ g de tecido nervoso). Os animais do grupo HTD apresentaram maior concentração de GFAP seguido pelos grupos HNT, C, HTE e HTDE. Diferenças significativas foram encontradas entre os grupos HTD X HTE ($p=0,008$) e HTD X HTDE ($p=0,01$).

6. DISCUSSÃO

A hidrocefalia é uma condição neurológica de abrangente pesquisa e, apesar do grande avanço dos sistemas de derivação liquórica, a busca por terapias farmacológicas e neuroprotetoras atuantes como tratamento adjuvante e destinadas a atenuar lesões secundárias (como isquemia e trauma tecidual antes e após o procedimento cirúrgico) vem sendo cada vez maior (MCALLISTER et al., 2015; DEL BIGIO; DI CURZIO, 2016).

Diversos experimentos têm sido realizados utilizando o antioxidante Edaravone. O medicamento, já utilizado para o tratamento da ELA, apresenta efeitos terapêuticos devido às suas propriedades antioxidantes, visto que o estresse oxidativo faz parte do processo de morte neuronal nesta condição (CRUZ, 2018). Jami et al. (2015) investigaram os efeitos em neurônios dopaminérgicos e, os resultados obtidos mostraram que o tratamento neuroprotetor foi capaz de reverter os efeitos citotóxicos do peróxido de oxigênio (H_2O_2) sobre a viabilidade e morfologia das células cerebrais. Em outro estudo, concluiu-se que o Edaravone exerceu efeito neuroprotetor em um modelo experimental de traumatismo crânio encefálico, inibindo o estresse oxidativo, levando a uma diminuição da resposta inflamatória e da ativação glial, reduzindo a morte neuronal e melhorando consequentemente a função neurológica (WANG et al., 2011). Com base nestes estudos, hipotetizamos que os efeitos antioxidantes do Edaravone poderiam conferir neuroproteção também na hidrocefalia experimental. O estudo de nosso grupo de pesquisa realizado em 2016, mostrou que o Edaravone isolado ajudou na prevenção da morte celular, melhorou a resposta comportamental e apresentou atividade astrocitária ligeiramente reduzida. Já no presente estudo avaliamos se tais benefícios também seriam encontrados com o tratamento cirúrgico associado.

Na avaliação diária do peso corporal, apesar de não haver diferenças significativas, observamos que o grupo HTE foi o que alcançou a maior média de peso, poucas gramas a mais que o grupo C. E, em contrapartida, o grupo HTDE foi o grupo que registrou a menor média de peso. Podemos supor que essa pequena discrepância pode ter ocorrido devido à grande exposição à manipulação, ou seja, além de receberem a aplicação do medicamento todos os dias, os animais do grupo HTDE ainda foram submetidos ao procedimento cirúrgico invasivo (o organismo precisa de

tempo para gerenciar o estresse causado pela reação metabólica inflamatória do trauma cirúrgico, na qual o rato diminuiu consideravelmente o consumo de água e ração). Vale ressaltar também, que esses animais podem ter perdido mais peso por mostrarem maior atividade locomotora, como falaremos mais adiante no teste de open field. Já o grupo HTD, ganhou mais peso que o grupo HNT, assim como foi observado em outros estudos (DEL BIGIO; CROOK; BUIST, 1997; DEL BIGIO; KANFER; ZHANG, 1997).

Para avaliar o comportamento dos animais, utilizamos o teste de campo aberto (open field), que tem por finalidade analisar o desenvolvimento sensório-motor, comportamento deambulatório e atividade exploratória. O teste, de maneira geral, traz as vantagens de ser de fácil execução, de evitar manuseio dos animais durante a sua realização, não ser invasivo e de poder ser repetido diversas vezes durante o período experimental (TATEM et al., 2014). Em nossa pesquisa, apesar de não haver diferenças significativas, observamos que os animais HNT apresentaram pior condição motora, realizavam pouco ou nenhum movimento durante a avaliação, eram menos ativos e atentos, possuíam exploração horizontal e vertical reduzida, andavam em círculos e nas pontas dos pés, o que mantém a característica de instabilidade na marcha, assim como os resultados semelhantes relatados por outros autores (SILVA et al., 2018; LOPES; SLOBODIAN; DEL BIGIO, 2009). O melhor desempenho foi do grupo HTDE que se igualou com o grupo controle. Esses animais exploravam toda a arena movimentando-se com rapidez e, demonstravam comportamentos naturais com mais frequência (luta e autolimpeza corporal).

Nossa hipótese é que o Edaravone, como antioxidante e neuroprotetor, tem um importante papel na melhora motora, visto que, vários estudos já mostraram resultados positivos em diversas doenças ressaltando seu auxílio no comportamento motor, como: melhora da locomoção e do desempenho, sugerindo fator protetor contra a neurotoxicidade no SNC através do bloqueio da produção de EROs, em um modelo de degeneração dopaminérgica no SNC (KAWASAKI et al. 2007); maior efeito na recuperação motora quando o medicamento foi administrado até oito horas após lesão medular em ratos, o efeito se deu através da eliminação dos radicais livres, o que inibe o estresse oxidativo, diminuiu o processo inflamatório e a ativação glial, reduzindo a morte neuronal e melhorando a função neurológica (WANG et al. 2011). Animais tratados com Edaravone mostraram maior exploração na arena e padrão de marcha com base menos alargada, sugerindo que a administração do medicamento no

estágio inicial da hidrocefalia experimental possa ter efeitos neuroprotetores que contribuam com a melhora motora dos animais (GARCIA et al. 2016). A cirurgia de derivação liquórica, por sua vez, já mostrou proporcionar uma descompressão no encéfalo e, conseqüentemente, atenuar a progressão das lesões nas áreas motoras (CATALÃO et al. 2014). Hale et al. (1992), observaram que as características histológicas do córtex cerebral foram preservadas após a cirurgia de derivação liquórica em gatos hidrocefálicos. Os animais operados apresentaram recuperação da força muscular, da marcha funcional e retorno da função axonal, promovendo o reparo neuronal e a melhora motora. Desta forma, hipotetizamos que a soma das duas terapias (o medicamento associado à derivação) pode ter gerado maiores benefícios e influenciado melhores resultados.

O teste de labirinto aquático de Morris, tem como objetivo avaliar a habilidade motora do rato, assim como estudar a sua capacidade de localização espacial, o que fornece informações sobre memória espacial associativa. É também procedimento de fácil realização, cuja maior virtude, é a rápida possibilidade de treinamento (MORRIS, 1984). Em nossa análise geral, todos os animais obtiveram melhora do primeiro para o último teste realizado, tal fato se deve ao processo do treinamento. O grupo C melhorou 13 segundos, na comparação do primeiro teste para o último, o HNT= 8 segundos, o HTD= 13 segundos, o HTE= 6 segundos e o HTDE= 11 segundos. Apesar desses resultados, os grupos HTDE, HNT e o HTE, ficaram com tempos inferiores aos demais na última avaliação. Baseado neste resultado, acreditamos que o Edaravone não favoreceu a memória dos animais neste experimento, visto que não observamos diferenças com o grupo sem tratamento. O fato do grupo HTDE demorar mais para finalizar o teste e conseqüentemente ficar em último lugar, pode ter ocorrido devido a um maior estresse sofrido por esses ratos. Ao contrário do observado em nosso experimento, vários estudos apontam que o Edaravone contribuiu para a melhora da capacidade de memorização. Em um modelo de hemorragia intraventricular em ratos, os resultados mostraram melhora do aprendizado e redução dos danos à memória. Esses efeitos sugerem que o Edaravone pode ser um potencial agente terapêutico para a hemorragia, especialmente hemorragia intracerebral com extensão ventricular, por se mostrar capaz de reduzir o edema cerebral (CHEN et al., 2014). Em outro estudo experimental, o Edaravone melhorou o aprendizado espacial e os déficits de memória na doença de Alzheimer. Os autores concluíram que o medicamento pode ser utilizado como um novo agente para o tratamento dessa

enfermidade, por melhorar o sistema colinérgico e, proteger os neurônios da toxicidade oxidativa (YANG et al. 2015). Pesquisadores também evidenciaram que o Edaravone pode prevenir o comprometimento da memória em um modelo experimental de sofrimento pós-traumático, impedindo o comprometimento da memória de curto e longo prazo, melhorando o comprometimento cognitivo com seu mecanismo antioxidante (ALZOUBI et al., 2019). A característica principal do Edaravone é a sua propriedade antioxidante, mas, em uma pesquisa experimental realizada na doença de Alzheimer, mostrou também resultados positivos para outras propriedades distintas, como efeito antiinflamatório e modulação de disfunção colinérgica. Foi encontrado também melhora das funções cognitivas, no qual os ratos mostraram restauração dos níveis de acetilcolina no cérebro, ocorrendo a melhora progressiva da memória e a aprendizagem. Além disso, também diminuiu as citocinas inflamatórias, o que potencializa ainda mais sua capacidade restauradora (REETA; SINGH; GUPTA, 2017).

Para estudar as lesões provocadas pela hidrocefalia e as possíveis alterações celulares com o uso do Edaravone e derivação liquórica, utilizamos a análise histológica com coloração por hematoxilina e eosina. Devido o tecido cerebral sofrer com a compressão e estiramento, prejudicando principalmente os axônios da substância branca periventricular, podemos observar traumas teciduais através do confronto visual, como: edema, rasgos e picnose causados pelo aumento dos ventrículos principalmente nos animais hidrocefálicos sem nenhum tipo de tratamento, assim como já relatados em outros estudos (DEL BIGLIO et al, 2012; SILVA et al., 2018; GARCIA et al., 2016). A região do CC e da MG nos animais do grupo HTD, mostraram-se mais próximos ao dos animais do grupo C, ou seja, eram intensamente celularizados, com epitélio e núcleos celulares mais preservados, sem espaçamento e sem sinais de edema. No epêndima, a camada se manteve contínua, sem desnudamento e tiveram seu epitélio um pouco mais conservado, mostrando importante melhora com o uso da derivação liquórica na preservação celular. Em outro estudo de nosso grupo de pesquisa, os animais hidrocefálicos submetidos à derivação liquórica também apresentaram células endimárias menos achatadas, no entanto, persistiam pontos de ruptura, e destruição celular endimária, ou seja, algumas lesões foram definitivas enquanto outras foram parcialmente revertidas (SANTOS et al., 2016). Os animais do grupo HTE, aparentavam ter o tecido ligeiramente mais preservado e o grupo HTDE, apesar de mostrar alguns sinais de edema, picnose e

redução da população celular, também se mostrava com alinhamento endimário mais conservado. Suponhamos, portanto, que o tratamento conjunto ajudou, de certa forma, a preservar as fibras do corpo caloso, porém não preservou a população celular, tanto no CC quanto na MG. Resultados semelhantes foram encontrados em um trabalho que investigou outro antioxidante na hidrocefalia experimental, a Eritropoietina que, através da análise por hematoxilina e eosina, encontraram melhor aparência tecidual dos animais tratados, evidenciando o poder antioxidante do medicamento (SURYANINGTYAS et al. 2019).

Dentre as análises imunoistoquímicas, três avaliações foram realizadas: a contagem de astrócitos através do anticorpo GFAP, a proliferação celular na matriz germinativa utilizando a contagem do anticorpo Ki-67 e o estudo da morte celular, através do anticorpo caspase-3.

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC e desempenham funções essenciais para a sua homeostase, como manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, captação e liberação de diversos neurotransmissores, participação da barreira hematoencefálica e no funcionamento das sinapses (GOMES et al., 2013). Elas reagem a vários estímulos como inflamação, processo hipóxico-isquêmico e podem exercer ação protetora ou neurotóxica. As ações de proteção dos astrócitos são esperadas na fase inicial da lesão por sua capacidade de eliminar o glutamato extracelular, armazenar e suprir as células adjacentes com compostos energéticos (SURYANINGTYAS et al., 2019). A contagem dos astrócitos reativos por mm² e a análise qualitativa realizada através do escore, por confronto visual, foram realizadas na região do CC e da MG, áreas que apresentam astrogliose mais evidente. Na região do CC, o grupo C, assim como o grupo HTE apresentaram leve reação astrocitária, com astrócitos finos e delicados. Em seguida, o grupo HTD apresentou poucos astrócitos marcados, porém, com escore de reação maior que nos demais grupos hidrocefálicos tratados. Suponhamos que todo o procedimento cirúrgico e a própria implantação do cateter de derivação liquórica possa ter causado uma maior lesão glial. Os animais HTDE, apesar de ser um grupo com maior quantidade de astrócitos por mm² e escore de média intensidade, apresentavam células com características mais próximas das de repouso. Já os animais HNT, assim como encontrado por outros autores, apresentavam astrócitos intensamente marcados, com prolongamentos espessos, intensamente ramificados, com corpos celulares hiperplásicos e hipertróficos. Este aspecto mais grosseiro deve-se justamente ao fato dessas células

estarem ativadas para realizarem a reparação e a cicatrização do SNC, nos mais diferentes tipos de agressão, como em infecções virais, doenças desmielinizantes, inflamações, lesões cerebrais agudas traumáticas e em doenças neurodegenerativas (SANTOS et al., 2016; ESKANDARI; HARRIS; MCALLISTER, 2011; CATALÃO et al., 2014; MUCKE et al., 1991).

Na região da MG os animais HTD e HNT apresentaram maior número de astrócitos e, conseqüentemente maior reação astrocitária. Os grupos C, HTE e HTDE apresentaram menor reação e receberam escore mínimo, o que poderia indicar resultados positivos após o uso do medicamento. Outros pesquisadores, também investigaram os possíveis efeitos neuroprotetores do Edaravone, injetando lipopolissacarídeo bacteriano e H₂O₂ para análise da reação astrocitária em ratos. Os resultados encontrados foram que o tratamento conseguiu reverter efetivamente a diminuição da viabilidade celular sob estresse oxidativo induzido, que gerou efeito citoprotetor além de restaurar efetivamente o colapso morfológico nos astrócitos, como perda de crescimento e encolhimento do corpo celular (GUO et al., 2020). Em outro trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, os animais tratados com o medicamento também demonstraram pequena agressão nessas estruturas cerebrais, apresentaram leve reação astrocitária quando comparados com os animais hidrocefálicos que não receberam o tratamento (GARCIA et al., 2016). Baseado nos resultados encontrados suponhamos, portanto, que o Edaravone é um antioxidante eficaz na proteção dos astrócitos.

Para avaliação da proliferação celular na região da matriz germinativa, utilizamos a marcação por Ki-67. O antígeno que é um protótipo de proteína relacionada ao ciclo celular, é utilizado para demonstrar a fração de crescimento celular em vários tecidos e expresso por células em proliferação em todas as fases do ciclo celular ativo (G1, S, G2 e M), e ausente nas células em repouso (G0) (GERLACH et al., 1997). Pesquisadores realizaram um modelo de hepatectomia em porcos, para averiguar os efeitos do Edaravone, e os resultados foram positivos na lesão de isquemia e reperfusão no fígado e nas células marcadas com Ki-67, estas eram significativamente mais numerosas devido a proliferação celular encontrada nos animais que receberam o medicamento, comprovando seu efeito protetor contra esse tipo de lesão (SHIMODA et al., 2012). Em nosso trabalho, apesar de não encontrarmos diferenças significativas, os animais dos grupos hidrocefálicos apresentaram nítida e significativa redução do índice de células mitóticas marcadas

pelo Ki-67. Concluímos, portanto que, a indução da hidrocefalia reduz a proliferação celular na região da matriz germinativa, e o tratamento com Edaravone associada a derivação liquórica não resultou em recuperação nas taxas de proliferação celular, apesar de perceber uma tendência dos animais HTDE a ter mais células imunomarcadas, em comparação com os animais HNT. Em outro trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa, também não foi encontrado diferenças significativas entre os grupos hidrocefálicos não tratados e os animais tratados com derivação subcutânea, o que leva à diminuição das células imunomarcadas em animais hidrocefálicos comparando com os animais controles (SANTOS et al., 2016), assim como resultou vários outros estudos (DEL BIGIO et al., 1998; DI CURZIO et al., 2013; KHAN et al., 2006).

A caspase-3, uma enzima essencial na execução da apoptose, é uma das proteases que têm grandes funções no desenvolvimento neuronal normal e patológico, e quando ativada, catalisa a clivagem específica de muitas proteínas celulares importantes (PORTER; JANICKE, 1999; LOSSI; CASTAGNA; MERIGHI, 2018). Em nossa análise na

região do córtex cerebral observamos que os grupos que receberam o medicamento (HTE e HTDE), assim como o grupo C, apresentaram menos células em apoptose, evidenciando que o Edaravone foi eficaz e contribuiu de forma significativa na diminuição da morte celular. Outros estudos utilizando o medicamento também apontaram resultados positivos. No trabalho realizado anteriormente em nosso laboratório, o grupo HNT apresentou um maior número de células em apoptose quando comparado com os grupos HTE e C na análise do córtex cerebral, o que sugeriu seu efeito benéfico (GARCIA et al., 2016). Em outro estudo com resultados positivos, pesquisadores exploraram o Edaravone nas células- tronco neurais e concluíram que o pré e o pós-tratamento aumentaram a neurogênese, protegendo a apoptose no hipocampo após isquemia cerebral pela diminuição significativa da geração de EROs (LEI et al., 2014). O fármaco também mostrou ação protetora em modelos de cultura hiperosmótica de células epiteliais da córnea humana, onde reverteu parcialmente a geração de EROs, o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial, além de atenuar a morte celular (LI et al., 2017).

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras de tecido foi utilizado o método bioquímico ELISA por GFAP, principal proteína do filamento intermediário do astrócito, visando quantificar o nível de ativação astrocitária (PETZOLD et al., 2004).

Em nossos resultados observamos que os grupos que receberam o tratamento com Edaravone, tanto isolado quanto associado ao procedimento cirúrgico apresentaram uma redução significativa em relação ao grupo tratado apenas com a derivação e, em menor quantidade também, quando observamos o grupo sem tratamento. A melhora observada pode ser atribuída aos efeitos benéficos do medicamento já observados em outros estudos, como no estudo de Wang e colaboradores (2011), que também encontraram no Edaravone efeito antiinflamatório, eles utilizaram um modelo de rato com traumatismo crânio encefálico juntamente com o medicamento, e em seus resultados houve redução significativa na presença de citocinas inflamatórias e déficits neurológicos. Os autores deduzem que a inibição do estresse oxidativo levou à diminuição da resposta inflamatória e ativação da glia, ajudou na redução da morte neuronal, e conseqüentemente melhorou a função neurológica. Zhang e colaboradores (2005) ao tratar isquemia focal transitória no cérebro de camundongos observou que o Edaravone, quando administrado até 6 horas após o início da isquemia / reperfusão, reduziu significativamente o volume do infarto e melhorou os escores de déficit neurológico 24 horas após a reperfusão. O medicamento também suprimiu o acúmulo de proteína modificada na área da penumbra durante o período inicial após a reperfusão e reduziu a ativação microglial. De acordo com esses resultados, eles concluíram que o medicamento exerceu um efeito neuroprotetor precoce por meio da via de eliminação de radicais livres e um efeito antiinflamatório tardio.

Em nosso trabalho, observamos também que o grupo que foi tratado apenas com a cirurgia de derivação líquórica apresentou alta concentração de GFAP, o que nos indica que somente a cirurgia não é suficiente para resolver tal grau de inflamação e a associação com o tratamento medicamentoso foi essencial para a redução da taxa. É até mesmo possível que o próprio procedimento cirúrgico possa ter aumentado a astrogliose reativa, assim como também observado no estudo de Santos e colaboradores (2019), que encontraram altos níveis de GFAP após a cirurgia de derivação líquórica também em ratos hidrocefálicos, os pesquisadores hipotetizaram que a implantação e presença de um material estranho no cérebro possa ter potencializado os mecanismos celulares de defesa. Em outro estudo, os autores compararam o grau de astrogliose reativa em ratos após uma realizar uma punção no cérebro, eles avaliaram o número de astrócitos pela espessura de seus processos e pela intensidade da imunorreatividade da proteína glial fibrilar ácida em diferentes

intervalos. Os pesquisadores concluíram que após o trauma sofrido, ocorre uma proliferação ativa de astrócitos metabolicamente alterados com síntese aumentada de proteína glial fibrilar ácida no período de compensação adaptativa, o chamado "rebote" compensatório. O rebote compensatório e o 'declínio' descompensatório ilustram a plasticidade dinâmica da astrogliose reativa (MA et al., 1991). Encontramos em nosso trabalho maior concentração de GFAP nos animais do grupo controle, quando comparados com os grupos hidrocefálicos, tal resultado pode ser devido a uma deterioração do tecido cerebral perante ao grau da hidrocefalia, o que pode ter influenciado em maior número de astrócitos reativos nos animais controles.

Vários eliminadores de radicais livres estão sendo estudados e o Edaravone se destaca pela sua capacidade de se difundir no sistema nervoso central em várias doenças neurológicas. Além de seu efeito de eliminação de radicais hidroxila, produção de óxido nítrico e morte celular, verificou-se também efeitos benéficos sobre a inflamação, além de apresentar efeitos neuroprotetores em vários modelos animais de doença, incluindo acidente vascular cerebral, lesão cerebral traumática, doenças neurodegenerativas e tumores cerebrais (KIKUSHI, 2011). Seu efeito comprovado como eliminador de radicais livres sugere que o medicamento pode ter potencial para se tornar um tratamento eficaz de várias doenças neurológicas incluindo a hidrocefalia.

Sendo assim, podemos afirmar que o Edaravone associado à cirurgia de derivação liquórica melhora a performance comportamental, reduz a astrogliose reativa, ajuda a preservação celular e diminui o processo de morte celular, promovendo, conseqüentemente, a neuroproteção em ratos jovens hidrocefálicos.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

De acordo com as análises realizadas e com os resultados obtidos, podemos concluir que:

1. Os animais do grupo HTDE mostraram maior capacidade exploratória, movimentando-se com rapidez e demonstraram comportamentos naturais, como de luta e autolimpeza corporal com maior frequência.
2. O Edaravone não favoreceu a memória dos animais no teste de water maze, visto que não observamos diferenças com o grupo sem tratamento.
3. O tratamento conjunto ajudou, de certa forma, a preservar as fibras do corpo caloso, porém não preservou a população celular, tanto no CC quanto na MG.
4. O Edaravone é eficaz na redução da astrogliose reativa.
5. A indução da hidrocefalia reduz a proliferação celular na região da matriz germinativa, e o tratamento com Edaravone associada a derivação liquórica não resultou em recuperação nas taxas de proliferação celular, apesar de perceber uma tendência dos animais HTDE a ter mais células imunomarcadas, em comparação com os animais HNT.
6. Os grupos que receberam o medicamento (HTE e HTDE), assim como o grupo C, apresentaram menos células em apoptose na região do córtex cerebral.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- ALZOUBI, K. H. et al. Edaravone prevents memory impairment in an animal model of post- traumatic distress. **Behavioural Pharmacology**, v. 30, p. 201-207, apr. 2019.
- AQUINO, H. B. et al. Terceiro-ventriculostomia endoscópica: assoalhos do terceiro ventrículo difíceis. **Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 37. 2018.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-43, jul. 2010.
- BOOCKVAR, J. A.; LOUDON, W.; SUTTON, L. N. Development of the Spitz-Holter valve in Philadelphia. **Journal of Neurosurgery**, v. 95, n. 1, p. 145-7. jul. 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, may. 1976.
- CARDOSO, E. J. R. C. et al. Changes caused by hidrocephalus, induced by kaolin, in the corpus callosum of adult dogs. **Acta Cirurgica**, v. 26, p. 8-14, 2011.
- CATALAO, C. H. et al. Pre- and Postshunting Magnetization Transfer Ratios Are in Accordance with Neurological and Behavioral Changes in Hydrocephalic Immature Rats. **Developmental Neuroscience**, v. 36, n. 6, p. 520-531, 2014.
- CAVALCANTI, D. P.; SALOMÃO, M.A. Incidência de hidrocefalia congênita e o papel do diagnóstico pré-natal. **Jornal de Pediatria**, v.79, n. 2, p.135-140. 2003.
- CHEN, Z. et al. Neuroprotective effects of edaravone after intraventricular hemorrhage in rats. **Neuroreport**, v. 25, n. 9, p. 635-640, jun. 2014.
- CRUZ M. P. Edaravone (Radicava): A Novel Neuroprotective Agent for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 43, n. 1, p. 25–28, 2018.
- CUNHA, H. G. B. Hidrocefalia na infância. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 18, n. 2, p. 85-93, may. 2014.
- DADLANI, R. et al. Occam's razor in the management of ventriculoperitoneal shunt dysfunction: Diagnosis and management of an unusual pediatric case. **Asian Journal Neurosurgery**, v. 10, n. 2, p.177-180, apr. 2015.
- DEFEO, D. R.; MYERS, P.; FOLTZ, E. L. Histological examination of kaolin-induced hydrocephalus. Its implications in the therapy of animals with experimentally induced hydrocephalus. **Journal Neurosurgery**, v. 50, n. 1, p.70-4, jan. 1979.
- DEL BIGIO, M. R. et al. Cerebral White Matter Oxidation and Nitrosylation in Young Rodents with Kaolin-Induced Hydrocephalus. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 71, n. 4, p. 274-288, apr. 2012.

DEL BIGIO, M. R.; Crook, C. R.; BUIST R. Magnetic Resonance Imaging and Behavioral Analysis of Immature Rats with Kaolin-Induced Hydrocephalus: Pre- and Postshunting Observations. **Exp neurol**, v. 148, n.1, p.256-64, nov. 1997.

DEL BIGIO, M. R.; DI CURZIO, D. L. Nonsurgical therapy for hydrocephalus: a comprehensive and critical review. **Fluids and Barriers of The Cns**, v. 13, n. 1, p. 3, dec. 2015.

DEL BIGIO, M. R.; KANFER, J. N.; ZHANG, Y. W. Myelination Delay in the Cerebral White Matter of Immature Rats with Kaolin-induced Hydrocephalus Is Reversible. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 56, n. 9, p. 1053-1066, sep. 1997.

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

DETWILER, P. W., PORTER, R. W., REKATE, H. Hydrocephalus - clinical features and management. In: Choux, M., Di Rocco, C., Hockley, A., and Walker, M., (Eds.), **Pediatric Neurosurgery**, p. 253-274. 1999.

DI CURZIO, D. L.; TURNER-BRANNEN, E.; DEL BIGIO, M.R. Oral antioxidant therapy for juvenile rats with kaolin-induced hydrocephalus. **Fluids and Barriers of The Cns**, v. 11, n. 1, p. 23, 2014.

DI CURZIO, L.; BUIST, R. J.; DEL BIGIO, M. R. Reduced subventricular zone proliferation and white matter damage in juvenile ferrets with kaolin-induced hydrocephalus. **Experimental Neurology**, v. 248, p. 112-128, out. 2013.

DRAKE, J. M. The surgical management of pediatric hydrocephalus. **Neurosurgery**, v. 62, n. 2, p.633-640, feb. 2008.

DREHER, D.; JUNOD, A. Role of oxygen free radical in cancer development. **European Journal of Cancer**, New York, v. 32, n.1, p. 30-38, jan.1996.

ESKANDARI, R.; HARRIS, C. A.; MCALLISTER, J. P. Reactive astrocytosis in feline neonatal hydrocephalus: acute, chronic, and shunt-induced changes. **Child's Nervous System**, v. 27, n. 12, p. 2067-2076, ago. 2011.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, nov. 2000.

GARCIA, B. A. C. et al. Edaravone reduces astrogliosis and apoptosis in young rats with kaolin-induced hydrocephalus. **Child Nervous System**, v. 33, n. 3, p. 419-428. dec. 2016.

GERLACH, C. et al. Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 573-578. sept. 1997.

GINSBURG, M. D. et al. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 363-389, sept. 2008.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.

GUO, Z.; et al. Edaravone protects rat astrocytes from oxidative or neurotoxic inflammatory insults by restoring Akt/Bcl-2/Caspase-3 signaling axis. **Ibro Reports**, v. 8, p. 122-128, jun. 2020.

HALE, P. M. et al. Improvement of Cortical Morphology in Infantile Hydrocephalic Animals after Ventriculoperitoneal Shunt Placement. **Neurosurgery**, v. 31, n. 6, p. 1085-1096, dec. 1992.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p.1179-1180. apr. 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and medicine. New York: Oxford. v. 5. 2007.

HASLAM, R. H. A. The Nervous System. In: BEHRAN, R. E.; KLIEGMAN, R. M.; JENSON, H.; NELSON, W. E. Nelson. **Textbook of Pediatrics**, 16 th ed. WB Saunders Company: Philadelphia, 2000.

ISAACS A. M. et al. Age-specific global epidemiology of hydrocephalus: Systematic review, metanalysis and global birth surveillance. **Plos One**, v.13, oct. 2018.

JAMI, M. S. et al. Edaravone leads to proteome changes indicative of neuronal cell protection in response to oxidative stress. **Neurochemistry International**, v. 90, p.134–41, nov. 2015.

JANSSEN, L. J. et al. Excitatory and inhibitory actions of isoprostanes in human and canine airway smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, n. 2, nov, p.506-511. 2000.

KAHLE, K. T. et al. Hydrocephalus in children, **The Lancet**, v. 387, n. 10020, p. 788-799, fev. 2016.

KAWASAKI, T. et al. Edaravone (3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one), a Radical Scavenger, Prevents 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-Induced Neurotoxicity in the Substantia Nigra but Not the Striatum. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 322, n. 1, p. 274-281, apr. 2007.

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

KIKUCHI, K. et al. Beyond neurological disease: New targets for edaravone (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 28: p. 899-906, 2011.

KIKUCHI, K. et al. Potential of edaravone for neuroprotection in neurologic diseases that do not involve cerebral infarction (Review). **Experimental and therapeutic medicine**. v. 2, n. 5, p. 771-775, 2011.

KIKUCHI, K. et al. The Efficacy of Edaravone (Radicut), a Free Radical Scavenger, for Cardiovascular Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p.13909-30, jul. 2013.

KRISHNAN, P. et al. Neuroimaging in Pediatric Hydrocephalus. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 86, n. 10, p. 952-960, may. 2019.

KUPELLI, E.; YILMAZ, C.; AKÇAY, S. Pleural effusion following ventriculopleural shunt: Case reports and review of the literature. **Annals of Thoracic Medicine**, v. 5, n. 1, p. 166-70. jul-sept. 2010.

LEI, S. et al. Pre- and Posttreatment with Edaravone Protects CA1 Hippocampus and Enhances Neurogenesis in the Subgranular Zone of Dentate Gyrus After Transient Global Cerebral Ischemia in Rats. **Asn Neuro**, v. 6, n. 6, nov. 2014.

LEVI, M.; BRIMBLE, M. A Review of Neuroprotective Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 18, p. 2383-2397, sept. 2004.

LI, Y. et al. Edaravone protects against hyperosmolarity-induced oxidative stress and apoptosis in primary human corneal epithelial cells. **Plos One**, v. 12, n. 3, mar. 2017.

LOPES, L. S.; MACHADO, H. R.; LACHAT, J.J. Estudo do corpo caloso de ratos Wistar submetidos à hidrocefalia experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, suppl5, p. 10-14. 2003.

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

LOSSI L.; CASTAGNA, C.; MERIGHI, A. Caspase-3 Mediated Cell Death in the Normal Development of the Mammalian Cerebellum. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3999, dec. 2018.

MA, K. C. et al. The compensatory 'rebound' of reactive astrogliosis: glial fibrillary acidic protein immunohistochemical analysis of reactive astrogliosis after a puncture wound to the brain of rats with portocaval anastomosis. **Acta neuropathologica**. V. 82, p. 72-3, 1991.

- MARIGO, F. A.; CRONEMBERGER, S.; CALIXTO, N. Neuroproteção: situação atual no glaucoma. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 64, n. 2, p. 167-171, apr. 2001.
- MCALLISTER, J. P. et al. An update on research priorities in hydrocephalus: overview of the third national institutes of health-sponsored symposium opportunities for hydrocephalus research: overview of the third National Institutes of Health-sponsored symposium "Opportunities for Hydrocephalus Research. **Journal of Neurosurgery**, v. 123, n. 6, p. 1427-1438, dec. 2015
- MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, may. 1984.
- MUCKE, L. et al. Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. **The New Biologist**, v. 3, n. 5, p. 465-474. may. 1991.
- NORTON, W. T. et al. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. **Neurochemical Research**, v. 17, n. 9, p. 877-885, sept. 1992.
- PEREIRA, J. et al. Neuroendoscopia no tratamento da hidrocefalia obstrutiva. **Acta Médica Portuguesa**, v. 15, p. 355-364. 2002.
- PETZOLD, A. et al. An ELISA for glial fibrillary acidic protein. *Journal of Immunological Methods*. p. 169-77, apr. 2004.
- PORTER, A. G.; JANICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, n. 2, p. 99-104, jan. 1999.
- PRATES, M. A.; ZANON-COLLANGE, N. Hidrocefalia. In: BRAGA, F. M.; MELO, P. M P. **Neurocirurgia: Série Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar**. São Paulo: Manole. 2005.
- RAMEL, A.; WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 1, p. 2- 6. feb. 2004.
- REETA, K. H.; SINGH, D.; GUPTA, Y. K. Edaravone attenuates intracerebroventricular streptozotocin-induced cognitive impairment in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 45, n. 7, p. 987-997, mar. 2017.
- REKATE, H. L. The definition and classification of hydrocephalus: a personal recommendation to stimulate debate: a personal recommendation to stimulate debate. **Cerebrospinal Fluid Research**, v. 5, n. 1, p. 2-5, jan. 2008.
- ROTHSTEIN J. D. Edaravone: A New Drug Approved for ALS. **Cell**, v. 171, n. 4, nov. 2017.

SANTOS, M. V. et al. Behavioral and Biochemical Features of the Course and Surgical Treatment of Experimental Obstructive Hydrocephalus in Young Rats. **Developmental Neuroscience**. p. 1-10, apr. 2019.

SANTOS, M. V. et al. Ventricular-subcutaneous shunt for the treatment of experimental hydrocephalus in young rats: technical note. **Child's Nervous System**, v. 32, n. 8, p. 1507- 1511, feb. 2016.

SHIMODA, M. et al. Edaravone, A Free Radical Scavenger, Ameliorates Early-Phase Ischemia/Reperfusion Injury and Increases Hepatocyte Proliferation in A Pig Hepatectomy Model. **Archives of Clinical and Experimental Surgery**, v. 1, n. 3, p. 142, 2012

SHOESMITH, C. L.; BUIST, R.; DEL BIGIO, M. R. Magnetic resonance imaging study of extracellular fluid tracer movement in brains of immature rats with hydrocephalus. **Neurological Research**, v. 22, n. 1, p.111-116, jan. 2000.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219. jul. 1993.

SILVA, S. C. et al. Hyperbaric oxygen therapy reduces astrogliosis and helps to recovery brain damage in hydrocephalic young rats. **Child's Nervous System**, v. 34, n. 6, p. 1125- 1134, apr. 2018.

STAUFFER, U.G. Mal formações cirúrgicas do crânio e do encéfalo. In: RICKHAM, P. P.; SOPER, R.T.; STAUFFER, **U.G. Cirurgia pediátrica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1989.

SURYANINGTYAS, W. et al. Erythropoietin protects the subventricular zone and inhibits reactive astrogliosis in kaolin-induced hydrocephalic rats. **Child's Nervous System**, v. 35, n. 3, p. 469-476, jan. 2019.

TABRIZCHI, R. Edaravone, Mitsubishi-Tokyo. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 1, n. 3, p. 347-54, nov. 2000.

TATEM, K. S. et al. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. **Journal of visualized experiments**, n.91, p. 51785. sept. 2014.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 3-4, p. 145-155, may. 2003.

WANG, G. H. et al. Free-Radical Scavenger Edaravone Treatment Confers Neuroprotection Against Traumatic Brain Injury in Rats. **Journal of Neurotrauma**, v. 28, n. 10, p. 2123-2134, out. 2011.

WATANABE, K.; HAYASE, T. Radical scavenging mechanism of MCI-186. **Japan. Pharmacology e Therapeutics**, v. 17, n. 1, jan. 1997.

WELCH, K. The intracranial pressure in infants. **Journal of Neurosurgery**, v. 52, n. 5, p. 693-699, may. 1980.

WILLIAMS, M. A. et al. Priorities for hydrocephalus research: report from a National Institutes of Health-sponsored workshop. **Journal of Neurosurgery**, v.107, 345-357. 2007.

XIONG N. et al. Edaravone Guards Dopamine Neurons in a Rotenone Model for Parkinson's Disease. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, jun. 2011.

YANG, R. et al. Edaravone injection ameliorates cognitive deficits in rat model of Alzheimer's disease. **Neurological Sciences**, v. 36, n. 11, p. 2067-2072, 12 jul. 2015.

YOSHIDA H. et al. Neuroprotective Effects of Edaravone: A Novel Free Radical Scavenger in Cerebrovascular Injury. **CNS drug reviews**, v. 12, n.1, p. 9-20, 2006.

ZHANG, N. et al. Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. **Stroke**. v. 36, n. 10, p. 2220-25, sept. 2005.

ANEXO

Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado "*Avaliação do tratamento por derivação líquórica na hidrocefalia experimental induzida em ratos Wistar com aplicação diária de Edaravone*", registrado com o número **133/2016**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, 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), e 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 31 de outubro de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 60 ratos Wistar machos pesando 10g e 06 ratos Wistar fêmeas pesando 250g, oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 31/10/2016 a 05/04/2020.

We certify that the Protocol nº 133/2016, entitled "*Evaluation of treatment for CSF shunt in experimentally induced hydrocephalus in rats with daily application of edaravone*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 10/31/2016. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 60 male Wistar rats weighing 10g and 06 female Wistar rats weighing 250g, from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 04/05/2020.

Ribeirão Preto, 31 de outubro de 2016

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
(16)3315-3301