UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PÂMELLA DA SILVA BEGGIORA

**Neuroproteção em ratos hidrocefálicos tratados ou não cirurgicamente: a
Memantina como uma alternativa farmacológica**

Ribeirão Preto
2018

PÂMELLA DA SILVA BEGGIORA

**Neuroproteção em ratos hidrocefálicos tratados ou não cirurgicamente: a
Memantina como uma alternativa farmacológica**

Versão Original

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

Área de concentração: Morfologia e Medicina Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes.

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação parcial ou total 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

Beggiora, Pâmella da Silva.

Neuroproteção em ratos hidrocefálicos tratados ou não cirurgicamente: a Memantina como uma alternativa farmacológica/Pâmella da Silva Beggiora; Orientadora: Prof.^a Dra. Luiza da Silva Lopes. – Ribeirão Preto, 2018.
84f.: il.

Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2018.

Versão Original

1. Hidrocefalia; 2. Memantina; 3. Fármacos neuroprotetores; 4. Derivação liquórica.

BEGGIORA, P.S. Neuroproteção em ratos hidrocefálicos tratados ou não cirurgicamente: a Memantina como uma alternativa farmacológica. 2018. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre 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

Aos meus pais, Maresete e Laercio que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu vencesse mais uma etapa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes

Por toda confiança que depositou em mim desde meus primeiros dias no laboratório. Pelo apoio, atenção e paciência ao partilhar seus conhecimentos contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual. Muito obrigada!

Aos meus amigos e companheiros de laboratório

Por todos os dias de convivência, pelas risadas, pelo bom humor, pela troca de experiências e também por dividirem momentos difíceis e estressantes que fazem parte da pós-graduação. Cada parcela do companheirismo de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho. Levarei todos vocês em meu coração!

Funcionários do Departamento de Cirurgia e Anatomia

Pelo carinho, cuidado e disposição em ajudar sempre que necessário. Muito obrigada!

FAEPA – Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Ao auxílio financeiro na compra de materiais usados em minha pesquisa, congressos e demais eventos que participei.

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização deste trabalho, sem os quais seria impossível alcançar o objetivo final. Muito obrigada!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço primeiramente a **Deus**, por todos os obstáculos que venci para chegar até aqui, pelos novos amigos, por toda aprendizagem, por nunca perder a esperança em dias melhores e, principalmente, por me dar forças para nunca desistir do meu sonho.

À minha **família**, meus pais Maresete Olimpia da Silva Beggiora e Laercio Aparecido Beggiora, obrigada por serem compreensivos e por me apoiarem nas horas mais difíceis, pelo incentivo, pelos conselhos e principalmente por me ajudarem a seguir um caminho de sucesso e o meu namorado Phellip Peres Marques, por ser sempre meu companheiro, me escutar nos momentos de desespero e sempre me incentivando para conseguir continue investindo em minha carreira profissional. Obrigada, eu amo vocês!

A **APG/USP-RP** (Associação de Pós-Graduandos do campus Ribeirão Preto - USP) que me proporcionou conhecer pessoas incríveis e poder chama-los de amigos, que mesmo o trabalho sendo árduo pela luta por mais direitos aos pós-graduandos, pode tornar minha caminhada mais leve, alegre e motivante.

E claro as minhas amigas, praticamente irmãs, Stephanya Covas da Silva e Karine Rodrigues Pereira, por sempre me ajudarem e estarem comigo nos bons e maus momentos e que tiveram uma parcela enormemente significativa na conclusão do meu mestrado, me apoiando e mostrando que temos que seguir forte e não perder o foco. Muito obrigada!

Sou eternamente grata a todos vocês!

“O pensamento pode ter elevação sem ter elegância, e, na proporção em que não tiver elegância, perderá a ação sobre os outros. A força sem a destreza é uma simples massa.”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

BEGGIORA, P.S. **Neuroproteção em ratos hidrocefálicos tratados ou não cirurgicamente: a Memantina como uma alternativa farmacológica**. 2018. 84f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A hidrocefalia é um desequilíbrio no fluxo ou absorção do líquido cefalorraquidiano, resultando em uma dilatação no sistema ventricular. O tratamento da hidrocefalia usualmente utilizado é cirúrgico (shunt), mas nem todos os pacientes podem ser submetidos ao tratamento cirúrgico imediatamente após o diagnóstico. Com isso, medidas neuroprotetoras vêm sendo testadas a fim de minimizar as lesões teciduais envolvidas. A Memantina é antagonista não competitivo do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), que revelou ação neuroprotetora na Doença de Alzheimer. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta neuroprotetora da Memantina em animais tratados ou não com derivação liquórica. Foram utilizados ratos machos Wistar submetidos à hidrocefalia através de injeção intracisternal de caulim, divididos em cinco grupos: controle (n=10), hidrocefálicos sem tratamento (n=10), hidrocefálicos tratados com Memantina intraperitoneal (20mg/kg/dia) (n=10), hidrocefálicos derivados (n=10), hidrocefálicos derivados tratados com Memantina (n=10). Para avaliação do tratamento foram realizados testes de comportamento (open field, monitor automático de atividade, water maze e reconhecimento de objeto), estudos histológicos e imunoistoquímicos. O tratamento da Memantina resultou em importante melhora no desenvolvimento sensoriomotor ($p<0,05$), maior agilidade e exploração do ambiente, preservação da memória espacial e de reconhecimento e maior capacidade de aprendizagem ($p<0,05$). Reduziu a reação astrocitária no córtex e na matriz germinativa ($p<0,05$) por imunomarcagem do GFAP. Conclui-se que a Memantina oferece efeitos benéficos às estruturas que foram afetadas pelo aumento ventricular e pode ser considerada uma terapia adjuvante ao tratamento cirúrgico da hidrocefalia.

Palavras chave: Hidrocefalia; Memantina; Fármacos neuroprotetores; Derivação liquórica.

ABSTRACT

BEGGIORA, P.S. "**Neuroprotection in hydrocephalic rats, surgically treated or not: the memantine as a pharmacological alternative.**" 2018. 84f. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brazil, 2018.

Hydrocephalus is an imbalance in the flow or absorption of cerebrospinal fluid, resulting in a dilation of the ventricular system. The treatment of hydrocephalus usually used is surgical (shunt), but not all patients can undergo surgical treatment immediately after diagnosis. With this, neuroprotective measures have been tested in order to minimize the tissue lesions involved. Memantine is a non-competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, which revealed neuroprotective action in Alzheimer's disease. The aim of this study was to evaluate the neuroprotective response of Memantine in animals treated with or without a shunt. Male Wistar rats were submitted to hydrocephalus by intracisternal injection of kaolin, divided into five groups: control (n = 10), hydrocephalus without treatment (n = 10), hydrocephalus treated with intraperitoneal Memantine (20mg / kg / day) (n = 10), hydrocephalus treated with shunt (n = 10), hydrocephalus treated with shunt plus Memantine (n = 10). To evaluate the treatment, behavior tests (open field, automatic activity monitor, water maze and object recognition), histological and immunohistochemical studies were performed. The treatment with Memantine resulted in a significant improvement in sensorimotor development ($p < 0.05$), greater agility and exploration of the environment, preservation of spatial and recognition memory, and greater learning ability ($p < 0.05$). Reduced astrocytic reaction in the cortex and germ matrix ($p < 0.05$) by GFAP immunolabeling. It is concluded that Memantine offers beneficial effects to the structures that have been affected by the ventricular increase and can be considered an adjuvant therapy to the surgical treatment of hydrocephalus.

Keywords: Hydrocephalus; Memantine; Neuroprotective drugs; Shunt.

Lista de figuras

FIGURA 1: FÓRMULA ESTRUTURAL DA MEMANTINA.....	29
FIGURA 2: INDUÇÃO DA HIDROCEFALIA. AUXILIAR POSICIONA O ANIMAL E O PESQUISADOR REALIZA A INJEÇÃO PERCUTÂNEA NA CISTERNA MAGNA COM CAULIM 10%.....	34
FIGURA 3: ARENA <i>OPEN FIELD</i> , PARA ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DEAMBULATÓRIO DOS ANIMAIS.	37
FIGURA 4: PISCINA PARA O TESTE DE <i>WATER MAZE</i>	38
FIGURA 5: MONITOR AUTOMÁTICO DE ATIVIDADES.....	39
FIGURA 6: A) HABITUAÇÃO REALIZADA NO PRIMEIRO DIA; B) AQUISIÇÃO, REALIZADA NO DIA SEGUINTE DA HABITUAÇÃO; C) ENSAIO TESTE REALIZADO 2H APÓS A AQUISIÇÃO.	40
FIGURA 7: MÉDIA DO GANHO DE PESO DE CADA GRUPO, DURANTE A PESQUISA. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. OS GRUPOS C E HTM FORAM OS QUE ADQUIRIRAM MAIS PESO AO LONGO DA PESQUISA, JÁ O GRUPO HTDM FOI O QUE CHEGOU AO FINAL DO EXPERIMENTO COM MENOR PESO.	46
FIGURA 8: MÉDIA DO DESEMPENHO NO TESTE DE <i>OPEN FIELD</i> . C - CONTROLE, HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO, HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO, HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA E HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. O GRUPO C ATINGIU A MÉDIA DO ESCORE MAIOR A PARTIR DE P08. O GRUPO HTM TEVE A MÉDIA MAIOR QUE OS GRUPOS HTD, HTDM E HNT, CHEGANDO NO ÚLTIMO DIA DE AVALIAÇÃO (P20) COM A MESMA MÉDIA DO GRUPO C, JÁ O GRUPO HNT TEVE O PIOR DESEMPENHO AO LONGO DO TESTE.	47
FIGURA 9: GRÁFICO DO DESEMPENHO DOS GRUPOS POR DIA DE AVALIAÇÃO. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. EM P06 OS GRUPOS TIVERAM DESEMPENHO SEMELHANTE, JÁ NO TERCEIRO DIA DE TESTE (C) O GRUPO C OBTVE UM DESEMPENHO MELHOR, QUE MANTEVE ATÉ O FINAL DO TESTE (G). O GRUPO HTM APRESENTOU MELHOR DESEMPENHO QUE OS GRUPOS HIDROCEFÁLICOS, CHEGANDO AO FINAL DO TESTE (G) COM DESEMPENHO SEMELHANTE AO GRUPO C. O GRUPO HNT OBTVE O PIOR DESEMPENHO EM TODAS AS AVALIAÇÕES.	49

FIGURA 10: GRÁFICO COM AS MÉDIAS DE DESEMPENHO NO TESTE WATER MAZE. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. EM P10, NO PERÍODO DA MANHÃ, O GRUPO HTM FOI MAIS RÁPIDO, JÁ O GRUPO HTD E HNT FORAM OS MAIS LENTOS, NO PERÍODO DA TARDE, OS GRUPOS MELHORARAM O DESEMPENHO. EM P14, NO PERÍODO DA MANHÃ, OS ANIMAIS DIMINUÍRAM O RENDIMENTO, HTM E HTDM SE EQUIPARARAM E NO PERÍODO DA TARDE, O GRUPO HTDM DESTACA-SE SOBRE OS DEMAIS, O GRUPO HTM SE EQUIPAROU AO GRUPO C, O HTD MELHORA SEU DESEMPENHO E O HNT FOI O MAIS LENTO.....51

FIGURA 11: GRÁFICOS COM DESEMPENHO INDIVIDUAL DOS GRUPOS POR AVALIAÇÃO. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. EM P10 (A E B), OS GRUPOS TIVERAM UM DESEMPENHO SEMELHANTE EM AMBOS OS PERÍODOS, APESAR DE, À TARDE TENHAM MELHORADO SUAS NOTAS. EM P14, SEGUNDO DIA DE AVALIAÇÃO, OS GRUPOS HTM E HTDM ALCANÇARAM A PLATAFORMA SUBMERSA MAIS RAPIDAMENTE QUE OS GRUPOS HNT E HTD ($P<0,05$) NO PERÍODO DA MANHÃ (C). NO PERÍODO DA TARDE, TODOS OS GRUPOS MELHORARAM SUAS NOTAS E O GRUPO HTM SE EQUIPAROU AO GRUPO C (D).....52

FIGURA 12: GRÁFICO DA DISTÂNCIA PERCORRIDA NO MONITOR DE ATIVIDADES. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. OBSERVAMOS UMA EVOLUÇÃO NA MOVIMENTAÇÃO DOS ANIMAIS NA SEGUNDA AVALIAÇÃO, COM EXCEÇÃO DO GRUPO HNT. O GRUPO HTM FOI O QUE MAIS AUMENTOU SUA MOVIMENTAÇÃO NA ARENA COM O PASSAR DAS AVALIAÇÕES.54

FIGURA 13: GRÁFICO DA VELOCIDADE COMPARADA ENTRE OS GRUPOS. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. OS GRUPOS C E HTD MANTIVERAM SUAS VELOCIDADES NOS DOIS DIAS DE AVALIAÇÃO. JÁ OS GRUPOS HTM E HTDM FORAM MAIS ÁGEIS QUE OS ANIMAIS DO GRUPO NÃO TRATADO.55

FIGURA 14: GRÁFICO DA COMPARAÇÃO DO DESCANSO POR GRUPOS. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. O GRUPO HTDM PERMANECEU MAIS TEMPO EM DESCANSO NA PRIMEIRA AVALIAÇÃO. JÁ O GRUPO HTM, FOI O QUE MENOS DESCANSOU DURANTE AS DUAS AVALIAÇÕES.55

FIGURA 15: GRÁFICO DO TEMPO (S) DE EXPLORAÇÃO NO PERÍODO DE AQUISIÇÃO. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. OS GRUPOS C E HTM FORAM OS QUE MAIS EXPLORARAM OS OBJETOS FAMILIARES.56

FIGURA 16: GRÁFICO DO ÍNDICE DE RECONHECIMENTO (IR%) POR GRUPOS NO PERÍODO DO ENSAIO TESTE. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. OBSERVAMOS NO GRÁFICO QUE O GRUPO HTD (47,79) FICOU BEM PRÓXIMO DO GRUPO C (46,08%). OS GRUPOS HTM (54,07%) E HTDM (57,48%) FORAM OS QUE MAIS EXPLORARAM O OBJETO NOVO. O GRUPO HNT OBTVEU O MENOR IR% DO TESTE (26,62%).....57

FIGURA 17: FOTOMICROGRAFIAS DA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO CC DOS ANIMAIS, CONTROLES (A), HIDROCEFÁLICOS NÃO TRATADOS (B), HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO (C), HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM MEMANTINA (D) E HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA (E). NÃO HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS QUANTO AO PADRÃO DE COMPROMETIMENTO DE CC OBSERVADO ENTRE OS GRUPOS HIDROCEFÁLICOS. COLORAÇÃO: HE – HEMATOXILINA E EOSINA. OBJETIVA DE 10X. BARRA - 200µM.....58

FIGURA 18: FOTOMICROGRAFIAS DA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MG DOS ANIMAIS, CONTROLES (A), HIDROCEFÁLICOS NÃO TRATADOS (B), HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO (C), HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM MEMANTINA (D) E HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA (E). NOTA-SE QUE A POPULAÇÃO DE CÉLULAS NOS ANIMAIS HTD É BEM MAIOR ENTRE OS GRUPOS HIDROCEFÁLICOS. E QUANDO COMPARAMOS OS ANIMAIS HIDROCEFÁLICOS COM OS CONTROLES, PERCEBE-SE: ROMPIMENTO NO EPÊNDIMA (SETAS) E EDEMAS CELULARES

(CÍRCULOS). COLORAÇÃO: HE – HEMATOXILINA E EOSINA. OBJETIVA DE 10X. BARRA - 200µM.59

FIGURA 19: FOTOMICROGRAFIAS DA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO CTX DOS ANIMAIS, CONTROLES (A), HIDROCEFÁLICOS NÃO TRATADOS (B), HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO (C), HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM MEMANTINA (D) E HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA (E). NÃO NOTAMOS DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS, COM EXCEÇÃO DO GRUPO HNT QUE OBSERVA-SE UMA DESORDEM NAS CAMADAS CELULARES. COLORAÇÃO: HE – HEMATOXILINA E EOSINA. OBJETIVA DE 10X. BARRA - 200µM.60

FIGURA 20: GRÁFICO DA REAÇÃO ASTROCITÁRIA NO CORPO CALOSO. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. OBSERVAMOS QUE OS GRUPOS HNT E HTD OBTIVERAM O MAIOR Nº DE ASTRÓCITOS REATIVOS POR MM². O GRUPO HTDM SE EQUIPAROU AO GRUPO C E O GRUPO HTM FOI O QUE TEVE MENOS REAÇÃO ASTROCITÁRIA (A). NA AVALIAÇÃO POR ESCORE REFORÇOU-SE QUE OS GRUPOS HNT E HTD FORAM OS COM MAIOR REAÇÃO E O GRUPO HTM FOI O DE MENOR REAÇÃO, OBTENDO UMA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE ESSES DOIS GRUPOS (P=0,0004). O GRUPO HTDM E O GRUPO C TIVERAM MÉDIAS SEMELHANTES (B).61

FIGURA 21: FOTOMICROGRAFIAS DA IMUNOMARCAÇÃO POR GFAP EM ANIMAIS, C - CONTROLES (A), HNT - HIDROCEFÁLICOS NÃO TRATADOS (B), HTD - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO (C), HTM - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM MEMANTINA (D) E HTDM - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA (E). OBSERVA-SE QUE OS ANIMAIS DO GRUPO HTM E HTDM APRESENTAM ASTRÓCITOS EM REPOUSO DE PROLONGAMENTOS FINOS (SETAS), SE EQUIPARA COM O GRUPO C. JÁ OS ANIMAIS DO GRUPO HTD, NOTAM-SE UMA MAIOR MANIFESTAÇÃO DA REAÇÃO ASTROCITÁRIA COMO NO GRUPO HNT. OBJETIVA 40X. BARRA 20 µM.62

FIGURA 22: GRÁFICO DA AVALIAÇÃO DE IMUNOMARCAÇÃO POR GFAP NO CTX PROFUNDO. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. NA AVALIAÇÃO DA MÉDIA DE Nº DE ASTRÓCITOS REATIVOS POR MM², OBSERVAMOS DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ENTRE OS HTM x HTD (P=0,03); HTDM x HNT (P=0,01); HTDM x HTD (P=0,0009) (A).

NA AVALIAÇÃO POR ESCORE, QUANDO COMPARAMOS AS MÉDIAS DAS NOTAS DO GRUPO HTM COM OS GRUPOS C E HTD OBSERVA-SE UMA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DE ($P=0,002$) (B).....63

FIGURA 23: FOTOMICROGRAFIAS DA AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO CTX PROFUNDO DOS ANIMAIS, C - CONTROLES (A), HNT - HIDROCEFÁLICOS NÃO TRATADOS (B), HTD - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO (C), HTM - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM MEMANTINA (D) E HTDM - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA (E). OBSERVA—SE QUE A REAÇÃO ASTROCITÁRIA DOS ANIMAIS HTD E HNT ESTÃO MAIS GROSSEIROS. JÁ OS ANIMAIS HTM QUASE NÃO APRESENTAM REAÇÃO ASTROCITÁRIA E O GRUPO HTDM SE EQUIPARA COM O GRUPO C APRESENTANDO ASTRÓCITOS EM REPOUSO, COM PROLONGAMENTOS FINOS E DELICADOS (SETAS). IMUNOMARCAÇÃO: GFAP. OBJETIVA DE 40X. BARRA 20 μ M.....64

FIGURA 24: GRÁFICO DA IMUNOMARCAÇÃO POR GFAP NO CTX SUPERFICIAL. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. NA ANÁLISE DO Nº DE ASTRÓCITOS REATIVOS POR MM^2 , O GRUPO HTD FOI O QUE MAIS APRESENTOU REAÇÃO ASTROCITÁRIA E QUANDO COMPARADO COM O GRUPO C APRESENTA UMA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DE ($P=0,01$) (A). JÁ OS ANIMAIS DOS GRUPOS HTM E HTDM OBTIVERAM MENOS ASTRÓCITOS REATIVOS DO QUE OS GRUPOS C E HNT NA ANÁLISE DA MÉDIA DO ESCORE E O HTD CONTINUOU OBTENDO O MAIOR NÚMERO DE REAÇÃO (B).65

FIGURA 25: FOTOMICROGRAFIAS DA IMUNOMARCAÇÃO POR GFAP NO CTX SUPERFICIAL DE ANIMAIS, C - CONTROLES (A), HNT - HIDROCEFÁLICOS NÃO TRATADOS (B), HTD - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO (C), HTM - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM MEMANTINA (D) E HTDM - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA (E). OBSERVA-SE QUE OS ANIMAIS DO GRUPO HTDM SE EQUIPARARAM COM OS ANIMAIS CONTROLE, APRESENTANDO ASTRÓCITOS EM REPOUSO E DE PROLONGAMENTOS FINOS (SETAS). JÁ OS ANIMAIS HTD E HNT APRESENTARAM GRANDE REAÇÃO ASTROCITÁRIA. O GRUPO HTM NÃO NOTA-SE REAÇÃO ASTROCITÁRIA. OBJETIVA 40X. BARRA DE 20 μ M.....66

FIGURA 26: GRÁFICO DA IMUNOMARCAÇÃO POR GFAP NA MG. C - CONTROLE; HNT - HIDROCEFÁLICO NÃO TRATADO; HTD - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM DERIVAÇÃO; HTM - HIDROCEFÁLICO TRATADO COM MEMANTINA; HTDM - HIDROCEFÁLICO TRATADO

COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA. VERIFICOU-SE DIFERENÇA SIGNIFICATIVA DOS GRUPOS HTM x HTD ($P=0,03$); HTDM x HTD ($P=0,03$); HTM x C ($P=0,01$) (A). NA MÉDIA DAS NOTAS, OS GRUPOS HTM E HTDM TIVERAM MENOR REAÇÃO ASTROCITÁRIA DO QUE OS GRUPOS HNT E C, COM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA ($P<0,0001$) (B).67

FIGURA 27: FOTOMICROGRAFIAS DA IMUNOMARCAÇÃO POR GFAP NA MG DOS ANIMAIS, C - CONTROLES (A), HNT - HIDROCEFÁLICOS NÃO TRATADOS (B), HTD - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO (C), HTM - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM MEMANTINA (D) E HTDM - HIDROCEFÁLICOS TRATADOS COM DERIVAÇÃO E MEMANTINA (E). NOTA-SE NOS ANIMAIS TRATADOS PELA MEMANTINA UMA BAIXA REAÇÃO ASTROCITÁRIA, APRESENTANDO ASTRÓCITOS COM PROLONGAMENTOS FINOS E EM REPOUSO (SETAS). NOS ANIMAIS HTD, OBSERVA-SE EDEMAS (CÍRCULOS). E JÁ NOS ANIMAIS HNT UMA GRANDE QUANTIDADE DE REAÇÃO ASTROCITÁRIA. OBJETIVA 40X. BARRA DE 20 μ M. ...68

Lista de Tabela

TABELA 1: TAXA DE MORTALIDADE AO LONGO DA PESQUISA. DOS 65 UTILIZADOS, 18 ANIMAIS VIERAM A ÓBITO, SENDO CINCO QUE NÃO RESISTIRAM A ANESTESIA DURANTE A CIRURGIA (7,69%), 10 POR GRAVE SOFRIMENTO (15,38%), E TRÊS POR INFECÇÃO/HEMORRAGIA (4,61%).....45

Lista de siglas

AMPA – alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

BSA – borine sérum albumim (albumina bovina)

C – controle

Ca²⁺ - cálcio

CC – corpo caloso

CETEA – comissão de ética em experimentação animal

COBEA – colégio brasileiro de experimentação animal

CTx - córtex

DA – doença de Alzheimer

DAB – 3'3-diaminobenzidina

DVP – derivação ventriculoperitoneal

FMRP – faculdade de medicina de ribeirão preto

GFAP – glial fibrillary acidic protein (proteína ácida fibrilar glial)

GK-11 – gaciclidina

HE – hematoxilina e eosina

HNT – hidrocefálico

HRP – estreptavidina

HTD – hidrocefálico tratado com derivação

HTDM – hidrocefálico tratado com derivação e Memantina

HTM – hidrocefálico tratado com Memantina

iGLURs – ionotrópicos

IH – isquemia-hipóxia

ip – intraperitoneal

IR% - índice de reconhecimento

KA – cainato

LCR – líquido cefalorraquidiano

MA – monitor automático de atividade

MG – matriz germinativa

Mg²⁺ - magnésio

Na²⁺ - sódio

NMDAR – receptor N-metil-D-aspartato

OF – *open field*

PBS – fosfato buff saline (tampão fosfato-salino)

PIC – pressão intracraniana

RO – reconhecimento de objeto

SNC – sistema nervoso central

WM – *water maze*

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
	2.1 Fisiologia do líquido cefalorraquidiano	25
	2.2 Hidrocefalia	25
	2.2.1 Hidrocefalia experimental.....	26
	2.3 Receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR)	27
	2.4 Neuroproteção.....	28
	2.5 Memantina.....	28
	2.6 Justificativa para o uso da Memantina na hidrocefalia experimental.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
	3.1 Objetivo geral	31
	3.2 Objetivos específicos.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
	4.1 Animais.....	33
	4.2 Indução da hidrocefalia	33
	4.3 Formação dos grupos experimentais	34
	4.4 Derivação liquórica ventrículo-subcutâneo.....	35
	4.5 Estudos comportamentais	36
	4.5.1 Teste de campo aberto (<i>open field</i>)	36
	4.5.2 Labirinto aquático de Morris modificado (<i>water maze</i>).....	37
	4.5.3 Monitor automático de atividades.....	39
	4.5.4 Reconhecimento de objeto.....	39
	4.6 Perfusão cerebral e dissecação das estruturas.....	40
	4.7 Histoquímica e Imunoistoquímica.....	41
	4.8 Documentação fotográfica.....	42

4.9	Análise estatística.....	43
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Taxa de mortalidade.....	45
5.2	Análise comportamental	46
5.2.1	Peso corporal	46
5.2.2	Teste de campo aberto (<i>open field</i>)	47
5.2.3	Labirinto aquático de Morris (<i>water maze</i>)	50
5.2.4	Monitor automático de Atividades	53
5.2.5	Reconhecimento de Objeto.....	56
5.3	Avaliação Histológica	57
5.3.1	Coloração por hematoxilina e eosina	57
5.4	Avaliação imunoistoquímica	61
5.4.1	GFAP	61
6	Discussão	70
7	Conclusão.....	76
8	REFERÊNCIAS	78
9	Anexos.....	84

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A hidrocefalia é definida como o acúmulo excessivo de líquido cefalorraquidiano (LCR) no interior dos ventrículos cerebrais e é uma das condições neurológicas mais comuns e complexas da prática clínica (OLOPADE et al., 2012). O aumento progressivo do volume liquórico ocorre devido à diferença entre a formação e absorção do LCR, resultando na ventriculomegalia, que frequentemente ocasiona estiramento e compressão do tecido nervoso, redução do fluxo sanguíneo encefálico, além do aumento da pressão intracraniana (PIC) (DEL BIGIO MCALLISTER, 1999). O tratamento da hidrocefalia é a derivação ventriculoperitoneal (DVP), onde é realizada a introdução de uma válvula de drenagem unidirecional almejando derivar o líquido em excesso nos ventrículos cerebrais para a cavidade do peritônio (FACURE, 1972).

O momento ideal para a realização da intervenção cirúrgica ainda é considerado um problema, pois alguns pacientes podem apresentar condições clínicas desfavoráveis, seja por instabilidade hemodinâmica, graves infecções, ou por apresentarem ainda dilatação ventricular inicial. Assim, com o passar do tempo, lesões decorrentes da ventriculomegalia se agravam (HOPPE-HIRSCH et al., 1998), levando a uma cascata de morte celular, uma característica bem marcante de doenças neurodegenerativas, dessa forma, medidas neuroprotetoras são fundamentais (PLAZNIK; TARACH; LEHNER, 2004).

Alguns modelos animais são testados para o tratamento ou auxílio da hidrocefalia, que incluem a redução da produção de líquido, redução do processo inflamatório e fibroso e a neuroproteção de células cerebrais e axônios, buscando tanto o bloqueio/atraso do processo patológico, como a preservação de tecidos já lesados, podendo ser realizado através de fármacos (DEL BIGIO, 2016). A Memantina (3,5-dimethyladamantan-1-amine) é um antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), com potencial ação neuroprotetora para os neurônios em relação à excitotoxicidade, sem impedir a ativação fisiológica do receptor no Sistema Nervoso Central (SNC), já utilizado na Doença do Alzheimer (DA) (SCARPINI; SCHELTENS; FELDMAN, 2003).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fisiologia do líquido cefalorraquidiano

A formação do LCR é realizada principalmente pelo plexo coroide, estrutura localizada no interior dos ventrículos cerebrais. Essa produção ocorre nos ventrículos laterais, no 3º e no 4º ventrículo, por uma combinação de processos de difusão, pinocitose e transporte ativo (JOHANSON et al., 2008), o restante de sua produção se dá por células endoteliais, que revestem todo o sistema ventricular (OSHIO et al., 2005). A circulação liquórica é unidirecional, ou seja, inicia-se nos ventrículos laterais, flui através do forame interventricular (ou forame de Monro) para o terceiro ventrículo; em seguida, o fluxo direciona-se inferiormente, através do aqueduto do mesencéfalo (de Sylvius), até chegar ao quarto ventrículo; a partir de então o LCR ganha às cisternas liquóricas basais, através dos forames laterais (de Luschka) e do forame mediano (de Magendie), distribuindo-se, então, para o espaço subaracnóideo. Sua absorção se dá através das vilosidades aracnóides para a corrente sanguínea (venosa) (DAVIS, 2003).

2.2 Hidrocefalia

A hidrocefalia pode ser classificada de duas formas: obstrutiva ou não comunicante, em que haverá um bloqueio na circulação liquórica causado por tumores, processos infecciosos ou pela estenose do aqueduto. Ou então, classificada como não obstrutiva ou comunicante, em que o fluxo liquórico no interior dos ventrículos encontra-se normal, porém, existem alterações no espaço subaracnóideo causadas por malformações congênitas, síndromes craniofaciais e/ou hemorragia subaracnóidea (THOMPSON, 2009). Também pode ocorrer quando a capacidade absorptiva das granulações aracnóideas encontra-se inadequada ou insuficiente, geralmente observada durante o envelhecimento. Em casos excepcionais, poderá haver hipersecreção de LCR pelo plexo coroide, o que também dificultará a absorção efetiva.

Enquanto não realizado o tratamento da hidrocefalia, o tamanho ventricular pode aumentar progressivamente, com o potencial surgimento de sérias lesões cerebrais. As principais estruturas afetadas na hidrocefalia são: I- o epêndima - epitélio que reveste a superfície dos ventrículos cerebrais e do canal central da medula. Com sua compressão e estiramento, pode ser completamente rompido em casos mais graves de ventriculomegalia; II- a substância branca periventricular – conjunto de fibras nervosas (axônios), em sua maior parte mielinizadas. Em graus muito importantes de hidrocefalia, poderá ocorrer grave prejuízo da mielinização dessas fibras. Mais tardiamente, como forma de preenchimento dos pontos de grave lesão ou cicatrização, ocorrerá a astrogliose, em substituição aos axônios e a mielina lesionados (DEL BIGIO; MCALLISTER, 1999; MABE et al., 1990). A mais importante estrutura composta exclusivamente por fibras nervosas e células da glia, o corpo caloso, pode ser completamente destruído em graus extremos de hidrocefalia, devido à sua proximidade com os ventrículos laterais; III- o córtex cerebral, o hipocampo, os núcleos da base, o tálamo e o cerebelo, possuem seus neurônios mais preservados, mas podem ser comprometidos tardiamente em graus mais graves da hidrocefalia (SHOESMITH et al., 2000).

2.2.1 Hidrocefalia experimental

Técnicas de indução experimental de hidrocefalia vêm sendo praticadas há muito tempo. Várias substâncias depositadas na saída do quarto ventrículo já foram testadas em diversos animais, tais como algodão, sangue, glicerina, caulim, entre outras, com o intuito de causar obstrução no fluxo liquorico e hidrocefalia (CARDOSO et al., 2011). O uso do caulim tem sido preferido devido às vantagens que oferece, como alto índice de indução de hidrocefalia, baixo custo e facilidade de uso, podendo ser administrado por injeção percutânea na cisterna magna, sem a necessidade de cirurgias que possam produzir distorções do tecido nervoso que não aquelas resultantes exclusivamente da hidrocefalia (LOPES et al., 1998).

O caulim é um produto composto de silicato hidratado de alumínio, que quando injetado na cisterna magna do animal, inicia um processo inflamatório agudo nas meninges, originando uma obstrução na saída do quarto ventrículo (DEFEO et al., 1979).

2.3 Receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR)

No sistema glutamatérgico, o grupo de receptores ionotrópicos (iGLURs) é composto pelos seguintes agonistas: NMDA, AMPA e receptores kainato (KA) (BOWIE, 2008). Localizado na membrana pós-sináptica das sinapses excitatórias, o receptor NMDA, exibe uma permeabilidade maior aos cátions, principalmente ao Ca^{2+} , característica que permite um papel mais ativo nos mecanismos neurotóxicos (MCBAIN, 1994). Ele é composto por combinação de diferentes subunidades: NR1 (presença obrigatória), NR2_(A-D) e, em alguns casos, NR3 (HARDINGHAM, 2002).

Durante o repouso das membranas pós-sinápticas excitatórias, os íons de Mg^{2+} causam um bloqueio voltagem-dependente no receptor NMDA, impedindo assim o influxo de Ca^{2+} , entretanto quando ocorre a despolarização pós-sináptica (isso pode ocorrer também devido à ativação dos receptores AMPA), os íons de Mg^{2+} são expulsos (SATTLER, 2000). A ativação do canal ocorre pela combinação de duas moléculas de glutamato e duas de glicina ou D-serina, que permitirá o influxo de Ca^{2+} (KUBO, 2004; HARDINGHAM; BANDING, 2003). O Ca^{2+} ativa uma cascata de sinalizações intracelulares, permitindo que seja regulada a excitabilidade da membrana e a intensidade com que ocorre a transmissão sináptica (SATTLER, 2000).

Quando ocorrem concentrações elevada de glutamato na fenda sináptica ou quando sua absorção é inibida, desencarrega uma superestimulação de seus receptores e um influxo alto de Ca^{2+} no terminal pós-sináptico, que, somado a liberação das reservas intracelulares, elevam a concentração de Ca^{2+} acima do padrão, ativando os mecanismos intracelulares de excitotoxicidade levando a morte neural, portanto, a administração de um antagonista desse receptor pode ter benefício terapêutico (SATTLER, 2000, LIPTON, 2006).

2.4 Neuroproteção

É a combinação de uma ou mais estratégias que antagonize, intercepte ou atrase a sequência de eventos bioquímicos e moleculares prejudiciais que possam resultar em lesões irreversíveis (GINSBERG, 2008).

No SNC, ocorre o ciclo glutamato-glutamina, um processo realizado por transportadores específicos de astrócitos adjacentes à sinapse, que retira o excesso de glutamato da fenda sináptica, evitando o seu acúmulo no espaço extracelular. No astrócito, o glutamato é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase, depois a glutamina é liberada no meio extracelular. Através de transportadores específicos a mesma é levada para o terminal pré-sináptico, onde são reconvertidas em glutamato pela enzima glutaminase. Exercendo o principal papel na finalização da neurotransmissão e por consequência efeito neuroprotetor biológico (MOUSSA, 2007).

2.5 Memantina

A Memantina é um dos antagonistas do receptor NMDA, considerada um bloqueador de canal aberto, pois consegue bloquear o fluxo de corrente, após a abertura do canal. Destacando-se por apresentar ação neuroprotetora ao SNC relacionada à DA (LINPTON, 2004). Sua sintetização a princípio foi elaborada para ser utilizada como um agente antidiabético, mas mostrou ser ineficaz para tal função (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007). Foi possível observar que a administração da droga produz uma melhora significativa nas escalas cognitivas, agindo também no atraso da progressão das demências (GUAY, 2003), dessa forma, o uso da Memantina em pacientes com DA mostrou ser eficaz (KIRBY et al., 2006).

Sob condições fisiológicas, a Memantina é composta por três anéis com um grupamento de amino protonado, além de duas ramificações metila, responsáveis por prolongar o tempo de paragem no canal e retardar sua taxa de desbloqueio (figura 1) (LIPTON, 2006). Caso ocorra uma elevada concentração (10-500mM) desse medicamento, a recaptação de serotonina e de dopamina, e a função dos

receptores de acetilcolina nicotínicos, receptores serotoninérgicos, receptores sigma-1 e canais de Na^+ ativados por voltagem, podem ser afetados (PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007).

Figura 1: Fórmula da Memantina

Figura 1: Fórmula estrutural da Memantina.

Fonte: Wikipedia (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Memantin_Struktur.png).

Em comparação com os outros antagonistas não-competitivos, os efeitos colaterais da Memantina são considerados não prejudiciais. Sua atuação no SNC reduz a hiperativação do sistema NMDAR, inibindo o fluxo excessivo de Ca^{2+} em condições de excitotoxicidade neural (JOHNSON; KOTERMANSKI, 2006; PARSONS; STÖFFLER; DANYSZ, 2007; RAMMES; DANYSZ; PARSONS, 2008).

2.6 Justificativa para o uso da Memantina na hidrocefalia experimental

Uma vez que nem todos os pacientes podem receber o tratamento cirúrgico imediatamente, as lesões causadas pela hidrocefalia ao encéfalo vão se agravando com o decorrer do tempo, desencadeando neurotoxicidade e cascata de morte celular. Testamos a Memantina em um modelo experimental de hidrocefalia em ratos Wistar jovens, que também foram submetidos ao tratamento cirúrgico.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta neuroprotetora da Memantina na hidrocefalia experimental em ratos Wistar jovens submetidos ou não à cirurgia de derivação liquórica.

3.2 Objetivos específicos

Analisar:

- O comportamento motor e a memória;
- A citoarquitetura geral, presença de distorções e lesões no cérebro;
- E reação astrocitária;

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 em Experimentação Animal (CETEA) protocolo nº 96/2016 – 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 usados 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, a dieta padrão de laboratório para roedores e água foi oferecida *ad libitum* às mães. Os filhotes, na fase de desmame, também tiveram acesso à dieta e à água.

4.2 Indução da 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% em 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: Indução da hidrocefalia. Auxiliar posiciona o animal e o pesquisador realiza a injeção percutânea na cisterna magna com caulim 10%.

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

4.3 Formação dos grupos experimentais

- Grupo Controle (C): os animais não sofreram qualquer interferência (n=10).
- Grupo Hidrocefálico (HNT): os animais foram submetidos à hidrocefalia por injeção intracisternal de caulim no 7º dia de vida (n=10).
- Grupo Hidrocefálico Tratado com Memantina (HTM): os animais foram submetidos à hidrocefalia por injeção intracisternal de caulim no 7º dia de vida e receberam diariamente uma dose de Memantina intraperitoneal (ip) a partir do 8º dia de vida (n=10).

- Grupo Hidrocefálico Derivado (HTD): os animais foram submetidos à hidrocefalia por injeção intracisternal de caulim no 7º dia de vida, e derivados seis dias após (n=10).

- Grupo Hidrocefálico Derivado Tratado com Memantina (HTDM): os animais foram submetidos à hidrocefalia por injeção intracisternal de caulim no 7º dia de vida, receberam diariamente uma dose de Memantina intraperitoneal (ip) a partir do 8º dia de vida e derivados seis dias após a indução da hidrocefalia (n=10).

Todos os animais foram sacrificados com 28 dias de vidas e 21 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 seria sacrificado por dose excessiva de anestésico e excluído do estudo.

4.4 Derivação liquórica ventrículo-subcutâneo

No P7, 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 50mg/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 da 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 90º, conectado a um cateter de silastic que, após passagem pelo subcutâneo do pescoço, foi sepultado no subcutâneo do dorso, próximo à raiz da cauda. Para todo o procedimento cirúrgico 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 retornam à caixa-alojamento de origem. (SANTOS et al., 2016).

4.5 Estudos comportamentais

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

4.5.1 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 dia 6, após a injeção (P6). Cada animal foi observado individualmente em uma arena de acrílico transparente de 60 cm de comprimento e 45 cm de altura (Figura 3) no tempo cronometrado de 2 minutos, avaliando 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, consegue caminhar, porém a marcha apresenta base alargada, instável ou atáxica; 1 = mal consegue andar, mas ainda se alimenta; 0 = próximo da morte ou eutanasiado. Entre as observações de diferentes ninhadas de animais, a arena é limpa com sabão neutro diluído em água.

Figura 3: Arena de teste – *open field*

Figura 3: Arena *open field*, para análise do comportamento deambulatório dos animais.

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

4.5.2 Labirinto aquático de Morris modificado (*water maze*)

Para o estudo da memória e aprendizagem espacial, os ratos foram submetidos ao teste do 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 4). A temperatura da água da piscina é controlada em aproximadamente 22 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 possuem 60 segundos livres para nadar na piscina, sem a plataforma. A seguir, a plataforma é introduzida no tanque, posicionada em um dos quatro quadrantes que o dividem. O treinamento é feito em quatro séries, sendo que em cada uma, o animal é 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 é 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 foi colocado na plataforma para descanso por 15 segundos e, em seguida, recolocado junto à parede da piscina, iniciando uma nova sessão. O tempo gasto do ponto de partida até o encontro da plataforma de descanso foi cronometrado. 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 encontrar a plataforma até um tempo limite de 60 segundos, será colocado na plataforma para descanso por 30 s, e o tempo considerado para execução da tarefa naquela sessão será de 60 s. No final do teste, o animal é seco com uma toalha macia e mantido em uma caixa aquecida, e então, recolocado junto à mãe e aos outros filhotes do grupo. Entre cada animal examinado, toda sujeira (dejetos sólidos e partículas da cama de maravalha) visível na água é retirada com o auxílio de uma peneira, deixando a arena limpa para um novo teste.

Figura 4: Piscina para teste – *water maze*

Figura 4: Piscina para o teste de *water maze*.

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

4.5.3 Monitor automático de atividades

O monitor automático de atividades, (modelo EP 149, Insight Ltda., Brasil), aparelho que consiste em uma arena quadrada fechada, de 50 X 50 cm de diâmetro e 48 cm de altura com 16 sensores de infravermelho, com três cm de distância entre eles (Figura 5). A interrupção do feixe gera um impulso elétrico, o qual foi processado e transmitido para um computador. Os animais foram colocados individualmente no centro do aparelho para uma sessão de gravação de cinco minutos. Foram analisadas as seguintes respostas comportamentais: distância percorrida, em centímetros, velocidade e descanso.

Figura 5: Arena de teste - monitor automático de atividades

Figura 5: Monitor Automático de Atividades.

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

4.5.4 Reconhecimento de objeto

No teste de reconhecimento de objeto, o experimento começou com o período de habituação, durante o qual os animais foram deixados a explorar livremente o local durante 1 h. O local consiste numa caixa retangular aberta superiormente (40 cm de largura x 30 cm de comprimento x 30 cm de altura), com posicionamento de uma câmera de vídeo acima da caixa para gravação do teste. No

dia seguinte à habituação, cada animal foi colocado em uma das extremidades da caixa e liberado para exploração de dois objetos idênticos posicionados nas extremidades opostas a caixa, durante cinco minutos de teste (fase de aquisição). Foi considerado o tempo gasto na exploração de cada objeto. No ensaio teste, que foi realizado após duas horas da aquisição, um dos dois objetos foi substituído por um novo objeto, sendo ele diferente do objeto retirado quanto à cor e forma (Figura 6). O tempo gasto explorando o objeto foi cronometrado desde o momento em que o rato aproximou seu focinho a um centímetro desse objeto. O comportamento dos roedores foi analisado por um observador cego em relação aos animais controles, hidrocefálicos, tratados cirurgicamente ou não. Os dados foram expressos em percentagem do índice de reconhecimento (IR%), que será calculada como a percentagem do tempo gasto explorando o objeto novo / tempo gasto explorando o objeto novo + tempo gasto explorando o objeto familiar $\times 100$.

Figura 6: Teste de reconhecimento de objeto esquematizado

Figura 6: A) Habituação realizada no primeiro dia; B) Aquisição, realizada no dia seguinte da habituação; C) Ensaio teste realizado 2h após a aquisição.

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

4.6 Perfusão cerebral e dissecação das 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 0,8 mm (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 serão posteriormente homogeneizadas em água bidestilada, em proporção constante para todas as amostras, aliquotadas e recongeladas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer -80°C.

4.7 Histoquímica e Imunoistoquímica

Os cortes das amostras foram desidratados em soluções crescentes de álcool (50% a 100%) diafanizadas 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, foram corados com HE. Na coloração feita pelo método HE, foram observados a citoarquitetura geral, a distribuição das estruturas e a densidade celular.

Para o estudo imunoistoquímico, as lâminas foram mantidas em estufa a 60°C, por 30 min, e desparafinizadas em banhos sequenciais de xilol e álcool. Foram realizados estudos por imunoistoquímica para GFAP (glial fibrillary acidic protein) para avaliação da distribuição e aspecto morfológico da astroglia; foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol. Posteriormente foi feito o bloqueio com soro adequado a 10% em PBS, por 30 minutos em câmara úmida. Logo após, os cortes foram incubados, “overnight” à temperatura de 4°C com o anticorpo primário anti-GFAP (DAKO Z0334, Dinamarca). Lavado o anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado (anticorpo biotinilado de cabra anti-coelho - Santa Cruz Biotechnology SC-2040) diluído 1:300 em BSA. Após, foram incubados com o conjugado estreptavidina - HRP (BioLegend cat.405210) diluído 1:400 em PBS. A seguir, foram revelados com DAB (3,3'- diaminobenzidina - Sigma). Por fim, as lâminas foram submetidas à contracoloração 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®. Observação: para a imunoistoquímica, os cortes foram estendidos em lâminas histológicas Starfrost silanizadas.

4.8 Documentação fotográfica

Para documentação fotográfica das lâminas e contagem de células, foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse E200MV com sistema de captura digital de imagens (MOTICAN 10) com software dedicado em ambiente Windows MOTIC image plus 2.0, instalado no Laboratório de Proteção Cerebral na Infância. Para as ilustrações da dissertação e publicação foi utilizado um microscópio de luz AxiosKop2 plus (Carl Zeiss) e uma câmera digital AxioCam Hrc (Carl Zeiss) acoplados à um computador Pentium II equipado com o software Axio Vision 3.1 instalado no Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP – USP. Para as lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram fotografadas a região do corpo caloso, matriz germinativa, cápsula externa e núcleos da base, em objetiva de 10X.

Nas lâminas imunomarcadas com GFAP foram fotografadas as regiões do corpo caloso, córtex (interno e externo) e da matriz germinativa (objetiva de 40X),

nas quais foi realizada a contagem dos astrócitos reativos. Para classificação da reação astrogliol, foi ainda aplicado 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.

4.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados como médias (ou mediana). Para teste de normalidade foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para dados paramétricos foi usada a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, quando indicado. Para dados não-paramétricos, o teste usado foi o Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Taxa de mortalidade

Para o desenvolvimento da pesquisa, foi utilizado um total de 78 animais, sendo 13 animais saudáveis, 65 animais hidrocefálicos, solicitados ao Serviço de Biotério Central do campus da USP Ribeirão Preto. Para contabilizar os animais que vieram a óbito, dividimos em três grupos: I - Cirurgia; II- Sacrificio; III - Descarte de cérebro, totalizando 18 óbitos. A tabela a seguir mostra-nos as quantidades de animais por grupo:

Tabela 1: Taxa de mortalidade

Tabela 1: Taxa de mortalidade ao longo da pesquisa. Dos 65 utilizados, 18 animais vieram a óbito, sendo cinco que não resistiram a anestesia durante a cirurgia (7,69%), 10 por grave sofrimento (15,38%), e três por infecção/hemorragia (4,61%).

Causas	Cirurgia	Sacrificados (sofrimento)	Descarte de Cérebro
	5	10	1 (hemorragia)
			2 (infecção)
%	7,69%	15,38%	4,61%

No total, tivemos 27,68% de mortalidade na pesquisa, sendo, 7,69% dos animais durante a cirurgia de derivação liquórica, que não voltaram da anestesia após o termino do procedimento. Tivemos 15,38% de animais que foram sacrificados devido a sofrimento apresentado por grave perda de peso, desidratação ou até mesmo espasmos musculares. Durante a coleta de amostras, 4,61% dos animais tiveram seus encéfalos descartados, devido a presença de hemorragias/infecções.

5.2 Análise comportamental

5.2.1 Peso corporal

Figura 7: Gráfico com o ganho ponderal de peso durante o trabalho

Figura 7: Média do ganho de peso de cada grupo, durante a pesquisa. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Os grupos C e HTM foram os que adquiriram mais peso ao longo da pesquisa, já o grupo HTDM foi o que chegou ao final do experimento com menor peso.

No início do experimento, todos os animais estavam com o peso semelhante, apesar do grupo hidrocefálico não tratado (HNT) está em destaque no P0, que se refere ao dia em que foi realizada a indução da hidrocefalia. Em P1, primeiro dia pós-indução, já observamos os animais do grupo controle (C) começar um leve ganho, mas apenas em P07, sete dias pós-indução, que temos a diferença nítida entre o grupo C e os demais grupos, também em P07 vemos o declínio do grupo hidrocefálico tratado com derivação e Memantina (HTDM), suponhamos que esse declínio seja por causa da maior exposição à manipulação que o animal teve ao longo do experimento. Em P17, o grupo hidrocefálico tratado com Memantina (HTM), começa a ter maior ganho de peso em relação aos grupos HNT, HTDM e o

grupo hidrocefálico tratado com derivação (HTD), se aproximando do grupo C. Os grupos HNT e HTD, mantiveram pesos semelhantes ao longo de todo o experimento, já o grupo HTDM, teve uma média de peso menor entre todos.

5.2.2 Teste de campo aberto (*open field*)

O teste de *open field*, avalia os cuidados com a higiene, exploração do ambiente e marcha, para tal avaliação, foi utilizado um escore de 0 a 4, onde 0 é o pior desempenho (animal eutanasiado) e 4 o melhor desempenho (animal saudável). Em P06, primeiro dia de avaliação, os animais demonstraram um desempenho semelhante; a partir do P12, terceiro dia de avaliação, o grupo HTM começou a destacar-se dos demais grupos (HTD, HTDM e HNT), chegando ao último dia de avaliação (P20) com a média de desempenho igual ao do grupo C (média no último dia de avaliação=4). O grupo HNT, teve um aumento em suas médias, quando comparamos com o primeiro dia de avaliação (P06), mas foi o grupo com pior desempenho ao longo do teste (média no último dia de avaliação=2,8).

Figura 8: Gráfico do desempenho no teste do *open field*.

Figura 8: Média do desempenho no teste de *open field*. C - controle, HNT - hidrocefálico não tratado, HTD - hidrocefálico tratado com derivação, HTM - hidrocefálico tratado com Memantina e HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. O grupo C atingiu a média do escore maior a partir de P08. O grupo HTM teve a média maior que os grupos HTD, HTDM e HNT, chegando no último dia de avaliação (P20) com a mesma média do grupo C, já o grupo HNT teve o pior desempenho ao longo do teste.

Ao longo dos dias de avaliação foi possível observar a evolução de cada grupo. No primeiro dia de avaliação em P06, o comportamento dos animais era bem parecido, com uma pequena exploração do ambiente. A partir de P08, segundo dia de avaliação, o grupo C começou a explorar mais a arena do teste, tendo uma evolução aparente, permanecendo assim até o final. Observou-se que os animais do grupo HNT tinham as passadas alargadas, movimentos atáxicos e as patas em formato de “garra”. Ao final do teste (P20) os grupos HTD, HTM e HTDM, mostraram uma grande evolução em relação à exploração da arena, higiene corporal, destacando-se o grupo HTM que equiparou sua média ao do grupo C. O gráfico a seguir, nos mostra o desempenho individual dos grupos por dia de avaliação.

Figura 9: Gráficos das avaliações diárias no teste de *open field*

Figura 9: Gráfico do desempenho dos grupos por dia de avaliação. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Em P06 os grupos tiveram desempenho semelhante, já no terceiro dia de teste (C) o grupo C obteve um desempenho melhor, que manteve até o final do teste (G). O grupo HTM apresentou melhor desempenho que os grupos hidrocefálicos, chegando ao final do teste (G) com desempenho semelhante ao grupo C. O grupo HNT obteve o pior desempenho em todas as avaliações.

Analisando o gráfico da figura 9, no primeiro dia de avaliação (P06), os grupos permaneceram com o desempenho semelhante, pouca exploração do ambiente, quase não faziam a autolimpeza corporal, permanecendo mais parados. O grupo C mostrou um destaque em seu desempenho explorando mais a arena de teste a partir da segunda avaliação realizada (P08). Na terceira avaliação os animais saudáveis mostraram uma diferença entre os animais do grupo HNT e HTDM ($P=0,001$ e $P=0,0009$, respectivamente). No quarto dia de avaliação (P14), o grupo C atingiu a nota maior (escore=4) e uma diferença entre os animais não tratados ($P<0,0001$).

Em P16, o grupo HTD começou a melhorar seu desempenho motor, obtendo uma diferença com o grupo HNT significativa ($P=0,001$), os grupos HTM e HTDM também mostraram uma diferença com os animais não tratados ($P=0,0001$ e $P=0,001$, respectivamente). No penúltimo dia de teste (P18), os animais dos grupos C, HTD e HTM, melhoraram seus movimentos, exploração do ambiente de teste e diferenciaram-se do grupo HNT ($P<0,0001$) até o final do teste. Já o desempenho do grupo HTDM também evoluiu não como os demais grupos, porém, aumentou a exploração, a autolimpeza e obteve uma diferença com os animais não tratados ($P=0,006$), que aumentou ainda mais no último dia de teste ($P=0,002$).

5.2.3 Labirinto aquático de Morris (*water maze*)

Para a análise do teste *water maze* os animais tiveram seu desempenho classificado por tempo, sendo 60 segundos o limite máximo para tal realização. Foi realizado um treino no P09 (único período) e nos P10 e P14 (período da manhã e da tarde), sendo, nove dias pós-indução, 10 dias pós-indução e 14 dias pós-indução, respectivamente. O gráfico da figura 9, nos mostra os dias de avaliação/período por média de tempo gasto para executar o teste.

Figura 10: Gráfico de desempenho no teste *water maze*

Figura 10: Gráfico com as médias de desempenho no teste *water maze*. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM – hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Em P10, no período da manhã, o grupo HTM foi mais rápido, já o grupo HTD e HNT foram os mais lentos, no período da tarde, os grupos melhoraram o desempenho. Em P14, no período da manhã, os animais diminuíram o rendimento, HTM e HTDM se equipararam e no período da tarde, o grupo HTDM destaca-se sobre os demais, o grupo HTM se equiparou ao grupo C, o HTD melhora seu desempenho e o HNT foi o mais lento.

Com base nesse gráfico, podemos observar que os animais adquiriam melhor a aprendizagem espacial no período da tarde, com suas médias melhoradas, o que nos sugere que eles compreendiam o que era realizado no período da manhã e desempenhavam à tarde. O gráfico a seguir, nos mostra o desempenho individual de cada animal por períodos e dias de avaliação.

Figura 11: Gráfico de desempenho individual no *water maze*

Figura 11: Gráficos com desempenho individual dos grupos por avaliação. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Em P10 (A e B), os grupos tiveram um desempenho semelhante em ambos os períodos, apesar de, à tarde tenham melhorado suas notas. Em P14, segundo dia de avaliação, os grupos HTM e HTDM alcançaram a plataforma submersa mais rapidamente que os grupos HNT e HTD ($P < 0,05$) no período da manhã (C). No período da tarde, todos os grupos melhoraram suas notas e o grupo HTM se equiparou ao grupo C (D).

A partir dos gráficos da figura 11, no primeiro dia de avaliação (P10), os grupos HTM e HTDM se destacaram no encontro da plataforma submersa e o grupo HTD foi menos ágil para alcançar o objetivo do teste. No período da tarde, observamos uma melhora na agilidade dos animais para encontrar a plataforma,

mas mantiveram as médias semelhantes. Já em P14, segundo dia de avaliação, no período da manhã, os grupos HTM e HTDM alcançaram mais rapidamente a plataforma submersa que os grupos HNT e HTD, (HTM x HNT $p=0,0287$); (HTM x HTD $p=0,01$); (HTDM x HTD $p=0,01$).

O grupo HTD desde o primeiro dia de avaliação obteve o pior desempenho no teste, sendo o menos ágil dos grupos para alcançar a plataforma, porém, uma importante melhora foi observada no período da tarde em P14. O grupo HTM e C obtiveram valores muito semelhantes, já grupo HNT foi o pior na excussão do teste.

5.2.4 Monitor automático de Atividades

A análise do comportamento motor espontâneo realizado pelo monitor de atividades registrou a evolução dos animais em dois dias distintos. As avaliações consistiam em monitorar a distância percorrida, a velocidade e o descanso, sendo analisadas em P11 e P19 (dias pós-indução da hidrocefalia).

Na figura 12, observamos a comparação do comportamento motor entre os grupos. A priori notou-se uma maior movimentação na arena, com a exceção do grupo HNT que percorreu menor distância nos dois dias de avaliação e do grupo HTD com desempenho semelhante aos animais não tratados. O grupo HTM foi o que mais explorou a arena de teste, percorrendo maior distância, seguido do grupo C. O grupo HTDM obteve uma maior movimentação no segundo dia de avaliação, aumentando a distância percorrida durante o teste.

Figura 12: Gráfico da distância percorrida – Comparação entre grupos

Figura 12: Gráfico da distância percorrida no monitor de atividades. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Observamos uma evolução na movimentação dos animais na segunda avaliação, com exceção do grupo HNT. O grupo HTM foi o que mais aumentou sua movimentação na arena com o passar das avaliações.

A segunda variável analisada foi a velocidade que os animais obtiveram dentro da arena de teste. Quando comparamos as velocidades entre os grupos (figura 14) observamos que os animais do grupo C e do grupo HTD mantiveram a média da velocidade em ambas as avaliações. Já os grupos HNT e HTM diminuíram sua velocidade no segundo dia de avaliação, com destaque para do grupo HTM continuou sendo o mais rápido entre os dois. Já o grupo HTDM, foram os mais ágeis na segunda avaliação.

Figura 13: Gráfico da velocidade – Comparação entre grupos

Figura 13: Gráfico da velocidade comparada entre os grupos. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Os grupos C e HTD mantiveram suas velocidades nos dois dias de avaliação. Já os grupos HTM e HTDM foram mais ágeis que os animais do grupo não tratado.

O descanso foi a última variável analisada. No gráfico da figura 14, observamos que os animais do grupo HTDM permaneceram mais em repouso que os demais. Já os animais tratados com a Memantina, permaneceram menos tempo em descanso, sendo eles com maior mobilidade ao longo do desenvolvimento do teste.

Figura 14: Gráfico de descanso – Comparação entre os grupos

Figura 14: Gráfico da comparação do descanso por grupos. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. O grupo HTDM permaneceu mais tempo em descanso na primeira avaliação. Já o grupo HTM, foi o que menos descansou durante as duas avaliações.

5.2.5 Reconhecimento de Objeto

O teste de reconhecimento de objeto, realizado em dois dias consecutivos, conta com a utilização de objetos que foram explorados pelos animais com o intuito de avaliar a memória de reconhecimento. No período de aquisição (segundo dia de avaliação), os animais exploraram dois objetos iguais em cor e formato (Figura 15), objetos denominados familiares.

Figura 15: Gráfico do tempo (s) de exploração - Aquisição

Figura 15: Gráfico do tempo (s) de exploração no período de aquisição. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Os grupos C e HTM foram os que mais exploraram os objetos familiares.

Observamos no gráfico da figura 15, que o grupo C apresentou maior exploração (32,66 s), seguido do grupo HTM (29,55 s) e do grupo HTDM (26,18 s), o grupo HTD foi o que menos explorou (21,24) mesmo quando comparamos com o grupo HNT (25,39). Após duas horas ocorreu o ensaio teste. Nessa parte da avaliação foi retirado um dos objetos familiares e introduzido um objeto novo diferente em cor e formato. As médias do índice de reconhecimento (IR%) (Figura 16) foram comparadas por grupos, o grupo HTD (47,79%) semelhante ao do grupo C (46,08%). Já os grupos HTM (54,07%) e HTDM (57,48%), demonstraram maior interesse em explorar o objeto novo, o grupo HNT (26,62%) teve o IR% menor.

Figura 16: Gráfico do índice de reconhecimento (IR%) – Ensaio teste

Figura 16: Gráfico do índice de reconhecimento (IR%) por grupos no período do ensaio teste. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Observamos no gráfico que o grupo HTD (47,79) ficou bem próximo do grupo C (46,08%). Os grupos HTM (54,07%) e HTDM (57,48%) foram os que mais exploraram o objeto novo. O grupo HNT obteve o menor IR% do teste (26,62%).

5.3 Avaliação Histológica

5.3.1 Coloração por hematoxilina e eosina

O corpo caloso (CC) é um conjunto compacto de fibras nervosas que cruzam a linha mediana do cérebro, disposto imediatamente acima das cavidades dos ventrículos laterais. Nas análises realizadas por coloração de hematoxilina e eosina, observamos que os animais do grupo controle apresentavam o CC íntegro, com a camada endimária contínua, caracterizada por um epitélio cúbico simples de núcleos celulares centralizados. Os animais do grupo hidrocefálico não tratado apresentavam um comprometimento do epêndima, com células achatadas e edemaciadas, o CC estava com sinais de edema e rasgos vistos como espaçamento/esgarçamento entre suas fibras. Já os grupos que receberam os tratamentos, tiveram seu epitélio conservado, com uma leve presença de edema em suas células e fibras (figura 17).

Figura 17: Avaliação histológica por hematoxilina e eosina – CC

Figura 17: Fotomicrografias da avaliação histológica do CC dos animais, controles (A), hidrocefálicos não tratados (B), hidrocefálicos tratados com derivação (C), hidrocefálicos tratados com Memantina (D) e hidrocefálicos tratados com derivação e Memantina (E). Não há diferenças significativas quanto ao padrão de comprometimento de CC observado entre os grupos hidrocefálicos. Coloração: HE – hematoxilina e eosina. Objetiva de 10x. Barra - 200µm.

Fonte: Acervo pessoal (2018).

A região da matriz germinativa (MG) localiza-se no ângulo externo dos ventrículos laterais. No grupo controle, a MG apresentava células em grande número, epitélio e núcleos celulares preservados. No grupo hidrocefálico, por outro lado, podem ser observados células em baixo volume, epitélio rompido e fibras edemaciadas. No grupo hidrocefálico tratado com Memantina e no grupo hidrocefálico tratado com derivação, a MG encontrava-se com suas células edemaciadas, as fibras com esgarçamento/estiramento e epitélio conservado. Já no grupo que recebeu a combinação dos dois tratamentos, pode-se observar que a MG estava mais conservada, não obtinha a mesma quantidade de células, porém, se aproximou mais ao número de células do grupo controle (Figura 18).

Figura 18: Avaliação histológica por hematoxilina e eosina – MG

Figura 18: Fotomicrografias da avaliação histológica da MG dos animais, controles (A), hidrocefálicos não tratados (B), hidrocefálicos tratados com derivação (C), hidrocefálicos tratados com Memantina (D) e hidrocefálicos tratados com derivação e Memantina (E). Nota-se que a população de células nos animais HTD é bem maior entre os grupos hidrocefálicos. E quando comparamos os animais hidrocefálicos com os controles, percebe-se: rompimento no epêndima (setas) e edemas celulares (círculos). Coloração: HE – hematoxilina e eosina. Objetiva de 10x. Barra - 200µm.

A citoarquitetura geral do córtex cerebral (CTx), que localiza-se dorsalmente ao ventrículo lateral, apresentou, no grupo controle, a presença de seis camadas de células, que podem ser diferenciadas da superfície glial para profundidade em: camada molecular, camada granular externa, camada piramidal externa, camada granular interna, camada piramidal interna e camada multiforme. Nos animais do grupo hidrocefálico não tratado, o CTx apresentava uma desordem nas camadas de células, edemas em suas fibras e células. Já os animais tratados, tiveram suas camadas celulares do CTx preservadas e com as células levemente edemaciadas (Figura 19).

Figura 19: Avaliação histológica por hematoxilina e eosina – CTx

Figura 19: Fotomicrografias da avaliação histológica do CTx dos animais, controles (A), hidrocefálicos não tratados (B), hidrocefálicos tratados com derivação (C), hidrocefálicos tratados com Memantina (D) e hidrocefálicos tratados com derivação e Memantina (E). Não notamos diferenças entre os grupos, com exceção do grupo HNT que observa-se uma desordem nas camadas celulares. Coloração: HE – hematoxilina e eosina. Objetiva de 10x. Barra - 200µm.

5.4 Avaliação imunoistoquímica

5.4.1 GFAP

Os astrócitos, morfologicamente, apresentam um conjunto de corpos celulares pequenos de processos finos e são altamente ramificados, enquanto os astrócitos reativos possuem um corpo celular grande com processo espesso e de coloração escura. Analisamos o corpo caloso, o córtex profundo e superficial e a matriz germinativa. Nas figuras 20 e 21, podemos observar o nº de astrócitos reativos por mm². Os grupos HNT e HTD, foram os que mais obtiveram reação astrocitária por mm², apesar das médias próximas entre os grupos HTDM, HTM e C, o grupo HTM foi o com menor nº de astrócitos reativos **(A)**, e quando analisamos o escore, que classificou a reação astrocitária em notas de 0 a 2, o grupo HTM permaneceu com a nota menor, o que demonstrou menos astrócitos reativos, e quando comparado aos grupos HTD e HNT obteve uma diferença significativa (P=0,0004) **(B)**.

Figura 20: Gráfico da avaliação imunoistoquímica – GFAP – CC

Figura 20: Gráfico da reação astrocitária no corpo caloso. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Observamos que os grupos HNT e HTD obtiveram o maior nº de astrócitos reativos por mm². O grupo HTDM se equiparou ao grupo C e o grupo HTM foi o que teve menos reação astrocitária **(A)**. Na avaliação por escore reforçou-se que os grupos HNT e HTD foram os com maior reação e o grupo HTM foi o de menor reação, obtendo uma diferença significativa entre esses dois grupos (P=0,0004). O grupo HTDM e o grupo C tiveram médias semelhantes **(B)**.

Figura 21: Fotomicrográfrica da avaliação imunoistoquímica – GFAP – CC

Figura 21: Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP em animais, C - controles **(A)**, HNT - hidrocefálicos não tratados **(B)**, HTD - hidrocefálicos tratados com derivação **(C)**, HTM - hidrocefálicos tratados com Memantina **(D)** e HTDM - hidrocefálicos tratados com derivação e Memantina **(E)**. Observa-se que os animais do grupo HTM e HTDM apresentam astrócitos em repouso de prolongamentos finos (setas), se equipara com o grupo C. Já os animais do grupo HTD, notam-se uma maior manifestação da reação astrocitária como no grupo HNT. Objetiva 40x. Barra 20 µm.

Fonte: Acervo pessoal (2018).

O CTx também foi avaliado para a imunomarcção do GFAP, dividido em profundo e superficial. Na porção do CTx profundo (figura 22), quando analisamos o nº de astrócitos reativos por mm², observamos que os grupos HTM e HTDM foram os que menos apresentaram reação astrocitária, obtendo uma diferença significativa quando comparados aos grupos HTD e HNT (HTM x HTD P=0,03); (HTDM x HNT P=0,01); (HTDM x HTD P=0,0009). Já o grupo C ficou com média próxima do grupo HNT **(A)**. Na avaliação por escore, os grupos HTM e HTDM, continuaram com a menor nota, ou seja, menos astrócitos reativos. Quando comparamos o grupo HTM com os grupos C e HTD observa-se uma diferença significativa de P=0,002 **(B)**. A diferença também fica evidente quando analisamos as fotomicrografias (Figura 23).

Figura 22: Gráfico da avaliação imunoistoquímica – GFAP – CTx profundo

Figura 22: Gráfico da avaliação de imunomarcção por GFAP no CTx profundo. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Na avaliação da média de nº de astrócitos reativos por mm², observamos diferença significativa entre os HTM x HTD (P=0,03); HTDM x HNT (P=0,01); HTDM x HTD (P=0,0009) **(A)**. Na avaliação por escore, quando comparamos as médias das notas do grupo HTM com os grupos C e HTD observa-se uma diferença significativa de (P=0,002) **(B)**.

Figura 23: Fotomicrográfas da imunomarcação por GFAP – CTx profundo

Figura 23: Fotomicrografias da avaliação imunoistoquímica do CTx profundo dos animais, C - controles **(A)**, HNT - hidrocefálicos não tratados **(B)**, HTD - hidrocefálicos tratados com derivação **(C)**, HTM - hidrocefálicos tratados com Memantina **(D)** e HTDM - hidrocefálicos tratados com derivação e Memantina **(E)**. Observa—se que a reação astrocitária dos animais HTD e HNT estão mais grosseiros. Já os animais HTM quase não apresentam reação astrocitária e o grupo HTDM se equipara com o grupo C apresentando astrócitos em repouso, com prolongamentos finos e delicados (setas). Imunomarcação: GFAP. Objetiva de 40x. Barra 20 µm.

Fonte: Acervo pessoal (2018).

Na avaliação do CTx superficial (figura 24), quando analisados os nº de astrócitos reativos por mm^2 , os grupos HNT, HTM e HTDM obtiveram médias semelhantes. O grupo HTD apresentou mais reação astrocitária por mm^2 obtendo uma diferença significativa do grupo C ($P=0,01$) **(A)**. Nas médias das notas por escore, o grupo HTD continuou apresentando maior expressão de astrócitos do que os demais grupos, já os animais dos grupos HTM e HTDM obtiveram menos astrócitos reativos do que os grupos C e HNT **(B)**. O que evidencia na figura 25.

Figura 24: Gráfico da avaliação imunohistoquímica – GFAP – CTx superficial

Figura 24: Gráfico da imunomarcção por GFAP no CTx superficial. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Na análise do nº de astrócitos reativos por mm^2 , o grupo HTD foi o que mais apresentou reação astrocitária e quando comparado com o grupo C apresenta uma diferença significativa de ($P=0,01$) **(A)**. Já os animais dos grupos HTM e HTDM obtiveram menos astrócitos reativos do que os grupos C e HNT na análise da média do escore e o HTD continuou obtendo o maior número de reação **(B)**.

Figura 25: Fotomicrográfas da imunomarcção por GFAP – CTx superficial

Figura 25: Fotomicrografias da imunomarcção por GFAP no CTx superficial de animais, C - controles **(A)**, HNT - hidrocefálicos não tratados **(B)**, HTD - hidrocefálicos tratados com derivação **(C)**, HTM - hidrocefálicos tratados com Memantina **(D)** e HTDM - hidrocefálicos tratados com derivação e Memantina **(E)**. Observa-se que os animais do grupo HTDM se equiparam com os animais controle, apresentando astrócitos em repouso e de prolongamentos finos (setas). Já os animais HTD e HNT apresentaram grande reação astrocitária. O grupo HTM não nota-se reação astrocitária. Objetiva 40x. Barra de 20µm.

Fonte: Acervo pessoal (2018).

Por último avaliamos também a imunomarcção por GFAP na MG (figura 26), as médias do nº de astrócitos reativos por mm^2 , os grupos HTM e HTDM obtiveram menor reação astrocitária do que os grupos HNT, HTD e C, na comparação entre eles, verificou-se diferença significativa dos grupos HTM x HTD ($P=0,03$); HTDM x HTD ($P=0,03$); HTM x C ($P=0,01$) **(A)**. Na avaliação do escore, as notas dos grupos HTM e HTDM continuaram com média menor de reação. A correlação do grupo HTM com os grupos HNT e C; e do grupo HTDM com os grupos C e HNT obtiveram a mesma diferença significativa ($P<0,0001$) **(B)**. Podemos notar essa diferença nas fotomicrografias apresentadas na figura 27.

Figura 26: Gráficos da avaliação imunohistoquímica – GFAP – MG

Figura 26: Gráfico da imunomarcção por GFAP na MG. C - controle; HNT - hidrocefálico não tratado; HTD - hidrocefálico tratado com derivação; HTM - hidrocefálico tratado com Memantina; HTDM - hidrocefálico tratado com derivação e Memantina. Verificou-se diferença significativa dos grupos HTM x HTD ($P=0,03$); HTDM x HTD ($P=0,03$); HTM x C ($P=0,01$) **(A)**. Na média das notas, os grupos HTM e HTDM tiveram menor reação astrocitária do que os grupos HNT e C, com diferença significativa ($P<0,0001$) **(B)**.

Figura 27: Fotomicrografias da imunomarcação por GFAP - MG

Figura 27: Fotomicrografias da imunomarcação por GFAP na MG dos animais, C - controles **(A)**, HNT - hidrocefálicos não tratados **(B)**, HTD - hidrocefálicos tratados com derivação **(C)**, HTM - hidrocefálicos tratados com Memantina **(D)** e HTDM - hidrocefálicos tratados com derivação e Memantina **(E)**. Nota-se nos animais tratados pela Memantina uma baixa reação astrocitária, apresentando astrócitos com prolongamentos finos e em repouso (setas). Nos animais HTD, observa-se edemas (círculos). E já nos animais HNT uma grande quantidade de reação astrocitária. Objetiva 40x. Barra de 20µm.

Fonte: Acervo pessoal (2018).

Discussão

6 Discussão

A hidrocefalia ainda permanece um importante objeto de pesquisa, apesar do grande avanço dos sistemas de derivação liquórica, a busca por terapias farmacológicas destinadas a atenuar lesões secundárias, como trauma tecidual, antes e após o procedimento cirúrgico, como tratamento adjuvante para esta síndrome, vem sendo buscada (MCALLISTER et al., 2015, DEL BIGIO; DI CURZIO, 2016).

Para a realização do presente estudo, administramos Memantina (ip), antes e após cirurgia de derivação liquórica. Para a indução da hidrocefalia experimental, utilizamos a técnica por caulim, um silicato de alumino, que produz obstrução mecânica através de uma inflamação local após a injeção na cisterna magna, bloqueando a saída do quarto ventrículo (LOPES; SLOBODIAN; DEL BIGIO, 2009). Para o tratamento cirúrgico utilizamos uma técnica já estabelecida para o uso experimental, a derivação ventrículo-subcutânea, que busca o efeito do tratamento padrão da hidrocefalia (SANTOS et al., 2016). O período de experimentação, até os 28 dias de vida pós-natal dos animais, foi adotado em consequência da similaridade de maturação neurológica dos ratos, equivalente a um humano com seis meses de vida pós-natal (KHAN; ENNO; DEL BIGIO, 2006).

A Memantina é um antagonista do receptor NMDA e considerada um bloqueador de canal aberto, pois atua bloqueando o fluxo de corrente, após a abertura do canal (LINPTON, 2004). E por ser lipossolúvel, adentra a barreira hematoencefálica, se tornando viável para tratamentos de doenças neurológicas. Diversas pesquisas experimentais e clínicas demonstraram que este fármaco possui efeitos neuroprotetores sobre a DA (MINKEVICIENE et al., 2004) e modelos de IH (GAO et al., 2006). Em tecidos cerebrais hidrocefálicos há um aumento do Ca^{2+} intracelular (DEL BIGIO, 2000) e pode estar relacionado à superativação dos receptores NMDA, que também está envolvido a uma série de condições neurológicas, incluindo acidente vascular cerebral isquêmico, demência vascular e lesão axonal traumática (FAN et al., 2014).

Para a administração da dose de 20 mg / kg / dia de Memantina, nos embasamos em um experimento realizado anteriormente, que tal uso reduziu danos no hipocampo de ratos hidrocefálicos (CABUK et al., 2011).

Após a indução da hidrocefalia e formação dos grupos experimentais, analisamos o ganho de peso diário, um fator importante na avaliação da saúde no período inicial de vida (HAYES et al., 2017). Os animais que foram submetidos ao procedimento de indução, quando comparados com os animais controles, obtiveram um menor ganho de peso. Estudos com hidrocefalia experimental demonstram esse comportamento frequente em animais induzidos (CATALÃO et al., 2014; GARCIA et al., 2017), essa perda de apetite pode ser relacionada como consequência da condição neurológica (LOPES; SLOBODIAN; DEL BIGIO, 2009, SHAOLIN et al., 2015), que atribui deficiência locomotora que pode estar atrapalhando os animais na hora da busca pela amamentação. Os animais que foram submetidos ao tratamento cirúrgico também demonstraram menor ganho de peso, quando comparados aos animais saudáveis, esse resultado pode estar correlacionado ao fato de que o procedimento cirúrgico seja extremamente invasivo.

Com relação aos testes comportamentais, alguns fatores podem estar presentes durante o desenvolvimento de pesquisas com animais experimentais, como ansiedade e neofobia (medo de ambiente novo). A exposição a novos ambientes e tarefas podem causar medo e curiosidade, que dependem dos níveis de ansiedade para determinar uma maior ou menor exploração do ambiente (GRIEBEL et al., 1993; ANTUNES et al., 2011).

Nos testes de campo aberto (*open field* - OF) e monitor automático de atividades (MA) que avaliaram as condições motoras, notamos que os animais hidrocefálicos não tratados, apresentaram pior condição motora, em ambos os testes, como: sinais de ataxia, passadas alargadas, que eram ainda mais prejudicadas devido a cifose torácica provocando o encurvamento da coluna e menor exploração da arena, também foram relatados por outros autores em diversas pesquisas com animais hidrocefálicos, como em ratos (SILVA et al., 2018) e camundongos (LOPES; SLOBODIAN; DEL BIGIO, 2009) tornando uma característica específica daqueles aos quais não recebem tratamento para essa síndrome.

Já os animais que receberam o tratamento terapêutico, demonstraram uma melhora locomotora significantes nos teste de OF e MA, um maior interesse na exploração da arena, passadas mais estabilizadas, maior movimentação e menor permanência em descanso, foram notadas. Os animais que foram submetidos ao desvio liquórico com o passar do tempo, também se observa uma melhora nessas condições. Essa evolução no comportamento motor dos animais que receberam o tratamento de derivação pode ser evidenciada no trabalho em que Catalão (2014) submeteu animais a colocação do *shunt* funcional e não funcional, que mostrou a evolução motora do grupo que tinha o desvio funcional era superior aos dos não funcionais. O que nos leva a interpretar que, o auxílio do desvio liquórico proporciona uma descompressão no encéfalo, conseqüentemente amenizando a ampliação das lesões nas áreas motoras.

Os animais que receberam apenas o tratamento com a Memantina mostraram um desempenho superior aos demais animais hidrocefálicos nos dois testes motores, chegando a se equiparar aos animais saudáveis e por vezes superar as médias alcançadas por eles como ocorrido no MA. Isso levanta a possibilidade do uso da droga estar agindo como neuroprotetor nas regiões que desenvolvem conexões locomotoras, tendo em vista que, como os receptores NMDA situam-se nos neurônios pós-sinápticos das sinapses excitatórias e a comunicação entre os neurônios motores e os músculos esqueléticos são exemplos desses processos (PURVES; FITZPATRICK; LAMANTIA, 2016).

Já nos testes de memória (*water maze* – WM e reconhecimento de objeto – RO) revelaram que os animais que receberam o tratamento da droga tiveram um desempenho melhor entre os animais hidrocefálicos, sendo, mais ágeis para encontrar a plataforma submersa e exploraram por mais tempo o objeto novo ao que foram expostos. O que nos leva a acreditar que a Memantina desenvolve uma tendência para melhorar o desempenho da memória, já que seu uso revelou em estudos anteriores, uma preservação dos neurônios hipocâmpais de regiões específicas do hipocampo (CA1 e CA2), quando comparados aos animais hidrocefálicos sem tratamento através de análises por imunorreatividade de óxido nítrico, sabendo ainda que, o hipocampo é uma região de grande relevância quando falamos de memória, umas de suas funções é converter a memória de curto prazo

em memória de longo prazo e está relacionado com a navegação espacial (CABUK et al., 2011).

Através da coloração histoquímica por hematoxilina e eosina (HE), observamos que dentre os animais hidrocefálicos, aqueles que receberam o tratamento pela droga, houve uma maior organização nas camadas celulares, mantendo a integridade do córtex. Na matriz germinativa e no corpo caloso observou-se que seus epitélios estavam inteiros e leves esgarçamentos pelas suas fibras. Os traumas teciduais, como edema, rasgos e picnose que são ocasionados pela dilatação ventricular, foram encontrados nos animais que não receberam o tratamento, assim como observamos em estudos anteriores que isso ocorre, pois o tecido cerebral sofre compressão e alongamento, prejudicando principalmente os axônios da substância branca periventricular (DEL BIGIO et al., 2012) e as lesões nos axônios dessa região mostraram ser mediadas por mecanismos proteolíticos ativados por Ca^{2+} causados pela ventriculomegalia (DEL BIGIO, 2000). Como os receptores NMDA são canais que exibem uma permeabilidade maior aos cátions, principalmente ao Ca^{2+} (MCBAIN, 1994) e a Memantina sendo seu antagonista, consegue bloquear o fluxo desse cátion, após a abertura deste canal iônico (LINPTON, 2004). Podemos considerar que, a droga esteja bloqueando esses canais e conseguindo amenizar as consequências desse influxo intracelular de Ca^{2+} aumentado.

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC e desempenham funções essenciais para sua homeostase, como manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, captação/liberação de diversos neurotransmissores, participação na formação da barreira hematoencefálica e no funcionamento das sinapses (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013). Os dados resultantes da imunomarcagem por GFAP mostra-nos, que os animais hidrocefálicos tratados por Memantina obtiveram menor reação astrocitária principalmente no CTx e na MG, quando comparados os demais, até mesmo com os controles saudáveis. O ciclo glutamato-glutamina, é um processo realizado por transportadores específicos de células gliais (astrócitos) adjacentes à sinapse, que retira o excesso de glutamato da fenda sináptica, evitando o seu acúmulo no espaço extracelular e consequentemente a excitotoxicidade pela hiperativação dos receptores pós-sinápticos, como o NMDA (MOUSSA, 2007). O que nos permite preconizar que a

utilização da droga tenha princípios neuroprotetores. Os animais hidrocefálicos apenas derivados mostram uma melhora com a colocação do *shunt* assim como encontrado por Catalão (2014). Quando ocorrem lesões no tecido nervoso, os astrócitos reativos desempenham importante papel na fase de manutenção do SNC, monitorando ativamente e controlando os conteúdos moleculares e iônicos do espaço extracelular, essas agressões podem decorrentes de infecções virais, doenças desmielinizantes, inflamações e em doenças neurodegenerativas, como na DA (ENG; GHIRNIKAR, 1994). A extensa rede fibrilar criada pelos filamentos astrocitários em atividade, interfere de maneira importante no processo de regeneração axonal e na recuperação funcional do SNC (LEE et al. 2015), o que confirma os dados foram levantados por esse trabalho dos animais hidrocefálicos não tratados que apontaram intensa reação astrocitária, com astrócitos grosseiros e intensamente ramificados. Portanto, observamos que a Memantina não proporciona mudanças estruturais significativas após as lesões causadas pela hidrocefalia, mas uma nova rota de pesquisas e experiências merecem ser realizadas com o objetivo de avaliar os aspectos biomoleculares dos receptores NMDA e da Memantina na fisiopatologia da hidrocefalia, com a associação da derivação liquórica.

Conclusão

7 Conclusão

Após a administração de Memantina a 20 mg/kg/dia (ip), durante 21 dias de hidrocefalia e a realização da derivação liquórica, concluímos que:

- O comportamento locomotor dos animais tratados, tiveram seus níveis melhorados ao longo do tempo e também apresentaram uma preservação da memória;
- A citoarquitetura geral nos animais tratados apresentou uma menor presença de distorções e lesões no tecido;
- A reação astrocitária foi reduzida em estruturas periventriculares como o córtex e a matriz germinativa, com o tratamento da Memantina e com a associação de ambos os tratamentos.

Os resultados nos permite inferir que a Memantina tem efeitos benéficos e permite ser considerada como uma alternativa terapêutica adjuvante ao tratamento cirúrgico da hidrocefalia experimental.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. P. L. et al. Influência da fisioterapia no desenvolvimento neuropsicomotor de paciente com hidrocefalia. **Revista Brasileira em Promoção de saúde**, Fortaleza, v. 22, n. 3, p. 199-206, 2009.
- ANTUNES, F. D. et al. Automation of the free-exploratory paradigm. **J Neurosci Methods**, v. 197, n. 2, p. 216-20, 2011.
- BOWIE, D. Ionotropic glutamate receptors & CNS disorders. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 129-43, Apr 2008.
- CABUK, B. et al. Neuroprotective effect of memantine on hippocampal neurons in infantile rat hydrocephalus. **Turk Neurosurg**, v. 21, n. 3, p. 352-8, 2011.
- CATALÃO, C. H. et al. Camellia sinensis neuroprotective role in experimentally induced hydrocephalus in Wistar rats. **Childs Nerv Syst**, v. 30, n. 4, p. 591-7, 2014.
- CATALÃO, C. H. R., 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.
- CARDOSO, E. J. et al. Changes caused by hydrocephalus, induced by kaolin, in the corpus callosum of adult dogs. **Acta Cir Bras**, v. 26 Suppl 2, p. 8-14, 2011.
- CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. **Neuron**, v. 1, n. 8, p. 623-34, Oct 1988.
- DAVIS, G. H. Fetal hydrocephalus. **Clin Perinatol**, v. 30, n. 3, p. 531-9, Sep 2003.
- DEFEO, D. R. et al. Histological examination of kaolin-induced hydrocephalus. Its implications in the therapy of animals with experimentally induced hydrocephalus. **J Neurosurg**, v. 50, n. 1, p. 70-4, Jan 1979.
- DEL BIGIO, M.R.; MCALLISTER II, J.P. Hydrocephalus – Pathology. In: CHOUX, M., DI ROCCO, C. AL, E. **Pediatric Neurosurgery**, London, Churchill Livingstone p. 217-36, 1999.
- DEL BIGIO, M. R. Calcium-mediated proteolytic damage in white matter of hydrocephalic rats? **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 59, n. 11, p. 946-54, Nov 2000.
- DEL BIGIO, M. R.; WILSON, M. J.; ENNO, T. Chronic Hydrocephalus in Rats and Humans: White Matter Loss and Behavior Changes. **Ann Neurol**, v.53, p. 337-346, 2003.
- DEL BIGIO, M. R. Neuropathology and structural changes in hydrocephalus. **Dev Disabil Res Rev**, v. 16, n. 1, p. 16-22, 2010.

DEL BIGIO, M. R. et al. Cerebral white matter oxidation and nitrosylation in young rodents with kaolin-induced hydrocephalus. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 71, n. 4, p. 274-88, Apr 2012.

DEL BIGIO, M. R.; DI CURZIO, D. L. Nonsurgical therapy for hydrocephalus: a comprehensive and critical review. **Fluids Barriers CNS**, v. 13, p. 3, Feb 2016.

DI CURZIO, D. L. et al. Memantine treatment of juvenile rats with kaolin-induced hydrocephalus. **Brain Res**, v. 1689, p. 54-62, Jun 2018.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S. GFAP and Astrogliosis. **Brain Pathology**, v. 4, p. 229-237, 1994.

FACURE, J. J. Ventriculo-peritoneal shunt with valve in the treatment of childhood hydrocephalus. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 30, n. 1, p. 8-29, Mar 1972.

FAN, X.; JIN, W. Y.; WANG, Y. T. The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 160, 2014.

GAO, Y. et al. Long-term effects of memantine therapy on neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. **Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi**, v. 8, n. 1, p. 38-40, Feb 2006.

GARCIA, C. A. B. et al. Edaravone reduces astrogliosis and apoptosis in young rats with kaolin-induced hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 33, n. 3, p. 419-428, 2017.

GINSBURG, M. D. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 3, p. 363-89, Sep 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, p. 77, 2013.

GRIEBEL, G. et al. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. **Behav Pharmacol**, v. 4, n. 6, p. 637-644, 1993.

GUAY, D. R. Drug forecast: memantine, prototype of a new approach to treatment of dementia. **Consult Pharm**, v. 18, n. 7, p. 625-34, Jul 2003.

HAYES, M. et al. The longitudinal association between weight change and health-related quality of life in adults and children: a systematic review. **Obes Rev**, v. 18, n. 12, p. 1398-1411, 2017.

HARDINGHAM, G. E.; FUKUNAGA, Y.; BADING, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. **Nat Neurosci**, v. 5, n. 5, p. 405-14, May 2002.

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. **Trends Neurosci**, v. 26, n. 2, p. 81-9, Feb 2003.

HOPPE-HIRSCH, E. et al. Late outcome of the surgical treatment of hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 14, n. 3, p. 97-9, Mar 1998.

JOHANSON, C. E. et al. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. **Cerebrospinal Fluid Res**, v. 5, p. 10, May 2008.

JOHNSON, J. W.; KOTERMANSKI, S. E. Mechanism of action of memantine. **Curr Opin Pharmacol**, v. 6, n. 1, p. 61-7, Feb 2006.

KHAN, O. H.; ENNO, T. L.; DEL BIGIO, M. R. Brain damage in neonatal rats following kaolin induction of hydrocephalus. **Exp Neurol**, v. 200, n. 2, p. 311-20, 2006.

KAWAMATA, M.; OMOTE, K. Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca²⁺ concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. **Pain**, v. 68, n. 1, p. 85-96, Nov 1996.

KIRBY, J. et al. A systematic review of the clinical and cost-effectiveness of memantine in patients with moderately severe to severe Alzheimer's disease. **Drugs Aging**, v. 23, n. 3, p. 227-40, 2006.

KUBO, M.; ITO, E. Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. **Proteins**, v. 56, n. 3, p. 411-9, Aug 2004.

LEE, H. H. et al. Time Course and Characteristics of Astrocyte Activation in the Rat Brain after Injury. **Korean J Neurotrauma**, v. 11, n. 2, p. 44-51, Oct 2015.

LIPTON, S. A. Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. **J Alzheimers Dis**, v. 6, n. 6 Suppl, p. S61-74, Dec 2004.

LIPTON, S. A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 2, p. 160-70, Feb 2006.

LIPTON, S. A.; NICOTERA, P. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. **Cell Calcium**, v. 23, n. 2-3, p. 165-71, 1998 Feb-Mar 1998.

LIPTON, S. A.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N Engl J Med**, v. 330, n. 9, p. 613-22, Mar 1994.

LOPES, L.S.; MACHADO, H.R.; LACHAT, J.J. **Hidrocefalia experimental**. Robe Editorial, São Paulo, 1998.

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

MABE, H.; SUZUKI, K.; NAGAI, H. Cerebral blood flow after ventriculoperitoneal shunt in children with hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 6, n. 7, p. 388-91, Nov 1990.

MCALLISTER, J. P. An update on research priorities in hydrocephalus: overview of the third National Institutes of Health-sponsored symposium "Opportunities for Hydrocephalus Research: Pathways to Better Outcomes". **J Neurosurg**, v. 123, n. 6, p. 1427-38, 2015.

MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 11, n. 9, p. 379-87, Sep 1990.

MINKEVICIENE, R.; BANERJEE, P.; TANILA, H. Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 311, n. 2, p. 677-82, Nov 2004.

MOUSSA, C. E. et al. Inhibitors of glutamate transport modulate distinct patterns in brain metabolism. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 2, p. 342-50, Feb 2007.

MCBAIN, C. J.; MAYER, M. L. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. **Physiol Rev**, v. 74, n. 3, p. 723-60, Jul 1994.

OLOPADE, F. E.; SHOKUNBI, M. T.; SIRÉN, A. L. The relationship between ventricular dilatation, neuropathological and neurobehavioural changes in hydrocephalic rats. **Fluids Barriers CNS**, v. 9, n. 1, p. 19, Sep 2012.

OSHIO, K. et al. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. **FASEB J**, v. 19, n. 1, p. 76-8, Jan 2005.

PARSONS, C. G.; STÖFFLER, A.; DANYSZ, W. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. **Neuropharmacology**, v. 53, n. 6, p. 699-723, Nov 2007.

Pessoa, F. **Obra Essencial de Fernando Pessoa: Prosa Íntima e de Autoconhecimento**. Richard Zenith, Assírio & Alvim ed. 2007.

PLAZNIK, A., TARACH, E., LEHNER, M. NMDA receptor antagonists and their role in the treatment of neurodegenerative diseases. **Neurologica**, v. 4, p. 4-5, 2004.

Purves, A., Fitzpatrick, H.; LaMantia, W. **Neurociencia**. 5ªed. 2016.

RAMMES, G.; DANYSZ, W.; PARSONS, C. G. Pharmacodynamics of memantine: an update. **Curr Neuropharmacol**, v. 6, n. 1, p. 55-78, Mar 2008.

SANTOS, M. V. et al. Ventricular-subcutaneous shunt for the treatment of experimental hydrocephalus in young rats: technical note. **Childs Nerv Syst**, v. 32, n. 8, p. 1507-11, Aug 2016.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **J Mol Med (Berl)**, v. 78, n. 1, p. 3-13, 2000.

SCARPINI, E.; SCHELTENS, P.; FELDMAN, P. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. **Lancet Neurology**, v. 2, n. 9, p. 539-47, 2003.

SHAOLIN, Z. et al. Hydrocephalus induced via intraventricular kaolin injection in adult rats. **Folia Neuropathol**, v. 53, n. 1, p. 60-8, 2015.

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. **Neurol Res**, v. 22, n. 1, p. 111-6, Jan 2000.

THOMPSON, D. N. P. Hydrocephalus. **Surgery** v.27, n.3, p. 130-134, 2009.

WINBLAD, B.; PORITIS, N. Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). **Int J Geriatr Psychiatry**, v. 14, n. 2, p. 135-46, Feb 1999.

9 Anexos

ANEXO A – Certificado do comitê de ética de 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 “*Neuroproteção em ratos hidrocefálicos tratados ou não cirurgicamente: a Memantina como uma alternativa farmacológica*”, registrado com o número **096/2016**, 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), 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 25 de julho de 2016.

Este Protocolo prevê a utilização de 50 ratos Wistar machos pesando 15g e 05 ratos Wistar fêmeas pesando 400g, totalizando 55 animais oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 14/09/2016 a 10/09/2018.

We certify that the Protocol nº **096/2016**, entitled “*Neuroprotection in hydrocephalic rats, surgically treated or not: the memantine as a pharmacological alternative*”, 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 07/25/2016. 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 50 male Wistar rats weighing 15g and 05 female Wistar rats weighing 400g (total= 55 animals) from the Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 09/10/2018.

Ribeirão Preto, 25 de julho de 2016

Prof. Dr. Bernardo Silva Carneiro
 Vice-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