UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

GUSTAVO BOTELHO SAMPAIO

**Avaliação dos efeitos da quercetina nas lesões cerebrais secundárias à hidrocefalia
experimental em ratos**

Ribeirão Preto

2019

GUSTAVO BOTELHO SAMPAIO

**Avaliação dos efeitos da quercetina nas lesões cerebrais secundárias à hidrocefalia
experimental em ratos**

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

2019

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

Sampaio, Gustavo Botelho.

Avaliação dos efeitos da quercetina nas lesões cerebrais secundárias à hidrocefalia experimental em ratos /Gustavo Botelho Sampaio; Orientadora: Luiza da Silva Lopes. – Ribeirão Preto, 2019.

79 f: il.

Dissertação de Mestrado - Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2019.

Versão Original

1. Hidrocefalia. 2. Neuroproteção. 3. Estresse oxidativo. 4. Derivação ventrículo-peritoneal.

SAMAPIO, G.B. Avaliação dos efeitos da quercetina nas lesões cerebrais secundárias à hidrocefalia experimental em ratos. 2019. 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

Dedico esta obra à minha família, em especial à minha esposa e ao meu filho Gabriel.

“É uma pena que os humanos não possam encontrar toda sua satisfação na contemplação científica”

(Niels Bohr, 1954)

RESUMO

SAMPAIO, G.B. “**Avaliação dos efeitos da quercetina nas lesões cerebrais secundárias à hidrocefalia experimental em ratos**”. 2019. 79f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A hidrocefalia é uma doença que afeta não só a dinâmica do líquido cefalorraquidiano, mas também outras estruturas do sistema nervoso central. Apesar do tratamento com derivações liquóricas ser eficiente na redução da ventriculomegalia, muitos danos neurológicos não são revertidos com a cirurgia. Vários estudos demonstram que o estresse oxidativo está envolvido na gênese das lesões na hidrocefalia. Objetiva-se avaliar os efeitos da quercetina nas lesões secundárias à hidrocefalia experimental em ratos. Foram utilizados ratos machos com sete dias de vida, que recebem a injeção de caulim a 15% na cisterna magna para indução da hidrocefalia. Foram divididos em grupo controle (C), hidrocefálico não tratado (HN), hidrocefálico derivado (HD), hidrocefálico tratado com água destilada (HA), hidrocefálico tratado com água destilada e derivação (HDA), hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal (HQp), hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e derivação (HDQp), hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem (HQg), hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e derivação (HDQg). A quercetina apresentou significativamente uma melhora nos marcadores imunoistoquímicos, principalmente caspase-3 e GFAP. Não houve alteração significativa na avaliação clínica/comportamental. A utilização da quercetina isolada não altera o volume e tamanho ventricular e a realização de derivação ventriculo-subcutânea em ratos recém-nascidos com hidrocefalia apresenta uma alta morbi-mortalidade.

Palavras chave: Hidrocefalia; Neuroproteção; Estresse Oxidativo; Derivação ventriculo-peritoneal.

ABSTRACT

SAMPAIO, G.B. “Evaluation of the effects of quercetin on brain lesions secondary to experimental hydrocephalus in rats”. 2019. 79f. School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brazil, 2019.

Hydrocephalus is a disease that affects not only the dynamics of the cerebrospinal fluid, but also other structures of the central nervous system. Although CSF derivation is effective in reducing ventriculomegaly, many neurological damage is not reversed with surgery. Several studies have shown that oxidative stress is involved in the genesis of hydrocephalus lesions. The objective of this study was to evaluate the neuroprotective response of quercetin in hydrocephalus. Male rats with seven days of life were used, which received the 15% kaolin injection in the cisterna magna for induction of hydrocephalus. They were divided into control group (C), untreated hydrocephalic (HN), derived hydrocephalic (HD), hydrocephalic treated with distilled water (HA), hydrocephalic treated with distilled water and shunt (HDA), hydrocephalic treated with quercetin peritoneal (HQp), hydrocephalic treated with quercetin peritoneal and derivation (HDQp), hydrocephalic treated with quercetin by gavage (HQg), hydrocephalus treated with quercetin by gavage and bypass (HDQg). Quercetin significantly improved the immunohistochemical markers, mainly caspase-3 and GFAP. There was no significant change in clinical / behavioral assessment. The use of isolated quercetin does not alter the volume and ventricular size and the realization of ventriculo-subcutaneous shunt in newborn rats with hydrocephalus presents a high morbi-mortality.

Keywords: Hydrocephalus; Neuroprotective Drugs; Oxidative Stress; Shunt.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Imagem demonstrativa da circulação liquórica, mostrando o trajeto do LCR nos ventrículos. **1-**Plexo coroide dos ventrículos laterais, evidenciando pelas setas a produção e passagem pelo forame intraventricular ou de Monro seguido pela passagem pelo aqueduto cerebral. **2-** Mostrando a passagem do LCR pelos forâmens laterais ou de Luschka e medial ou de Magendie. **3-**O LCR depois de passar pela região medular acende novamente até o crânio onde começa a ser reabsorvido na região da lâmina cribiforme e **4-**nas granulações aracnoides localizadas próximo ao seio venoso. 19
- Figura 2:** (A) Indução da hidrocefalia: o auxiliar posiciona o animal e o pesquisador realiza a injeção percutânea na cisterna magna com caulim 15%. (B) Animal com dez dias de vida, apresentando a macrocrania em decorrência da evolução da hidrocefalia. 31
- Figura 3:** Procedimento cirúrgico. (A) Materiais utilizados durante a cirurgia. (B) Animal com catorze dias de vida em decúbito ventral sob anestesia inalatória. (C) Degermação com iodo tópico degermante. (D) Degermação com iodo alcóolico. 32
- Figura 4:** A: Cicatriz cirúrgica no vigésimo primeiro dia de estudo; B: Cateter utilizado para realizar a DVSC com o guia metálico (seta branca) para manter a angulação de 90°. O guia era retirado antes da implantação do cateter; C: A seta branca mostra o acúmulo de líquido no espaço subcutâneo do animal no P21, na visão superior; D: A seta branca mostra o acúmulo de líquido, no mesmo animal, na região espaço subcutânea em uma visão lateral. 33
- Figura 5:** Gráficos representando a avaliação estatística da média do peso corporal dos animais em gramas. A: Média de peso final entre os grupos estudados; B: Ganho ponderal médio diário em gramas por dia, os círculos escuros representam o ganho médio diário de cada animal e as barras transversais a média diária dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos. 40
- Figura 6:** Análise da média diária de peso durante todos os dias do experimento P0 a P21, entre os grupos estudados, as linhas significam o ganho médio diário de peso entre os grupos estudados. 42
- Figura 7:** Avaliação da mediana do escore de marcha através do teste de comportamento de campo aberto(open field). A análise estatística não evidenciou diferença significativa na comparação entre os grupos. 43
- Figura 8:** Gráficos da análise do tempo médio em segundos necessário para que cada animal atingisse a plataforma no décimo dia P10 e no décimo quarto P14 dia de estudo. Sendo A: O gráfico do tempo médio necessário para os animais atingirem a plataforma no décimo dia pela manhã. B: O gráfico do tempo médio necessário para os animais atingirem a plataforma no décimo dia à tarde. C: O gráfico do tempo médio necessário para atingir a plataforma no décimo quarto dia pela manhã e em D: O gráfico do tempo médio necessário para que cada animal atingisse a plataforma no décimo quarto dia no período da tarde. 45
- Figura 9:** Cortes histológicos corados por HE, visualizados na objetiva de 10X na região da matriz germinativa, as linhas transversais representam 10µm. C = Controle. HD = Hidrocefálico derivado. HA= Hidrocefálico tratado com água destilada. HDA = Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. HQp = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. HQg = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. HDQp = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. HDQg = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. 47

Figura 10: Cortes histológicos do corpo caloso, visualizados em objetiva de 10x corados em HE. As linhas transversais representam 10 µm. **C** = Controle. **HD** = Hidrocefálico derivado. **HA** = Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA** = Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp** = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp** = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC49

Figura 11: Cortes histológicos do córtex cerebral, visualizados em objetiva de 10x, corados em HE. As linhas tracejadas representam 10 µm. **HD** = Hidrocefálico derivado. **HA**=Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA** = Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp** = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp** = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC.51

Figura 12: Cortes histológicos do corpo caloso, visualizados em objetiva de 10x, corados em solocromo-cianina. As linhas transversais representam 10µm. **C** = Controle. **HD** = Hidrocefálico derivado. **HA**=Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA** = Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp**=Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp** =Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. Não houve diferença significativa.53

Figura 13: (A) Avaliação da média da espessura do corpo caloso em milímetros entre os grupos estudados; as linhas tracejadas, pontilhadas ou retilíneas mostram alterações significativas entre os grupos e em (B) a avaliação da espessura média do corpo caloso entre os grupos de animais com DVSC e sem DVSC, houve diferença significativa na comparação entre o grupo C e Não derivados.....54

Figura 14: Avaliação imunoistoquímica KI-67, visualizados em objetiva de 40x. As linhas transversais representam 3µm. **HD**: Hidrocefálico derivado. **HA**=Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA**: Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSG. **HQp**: Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg**: Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp**: Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSG. **HDQg**: Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSG. Não houve diferença significativa entre os grupos.55

Figura 15: (A) Avaliação do número de células por mm² dos grupos estudados e em (B) a quantidade de células marcadas pelo anticorpo Ki67 em comparação com o total de celular encontradas por mm². Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos.....56

Figura 16: Gráfico da densidade das células imunomarcadas, em mm², por caspase-3 no corpo caloso dos grupos estudados. Não houve diferença significativa.....57

Figura 17: Cortes microscópicos com anticorpo caspase-3, visualizados com objetiva de 10, com estudo do corpo caloso dos grupos de animais estudados. As linhas transversais representam 5 µm. **C** = Controle. **HD**=Hidrocefálico derivado. **HA**= Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA**= Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp**= Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg**= Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp**= Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg**= Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. Houve diferença significa na comparação entre os grupos C x HDQg.58

Figura 18: Cortes microscópicos corados com anticorpo caspase-3, visualizados em objetiva de 10x, avaliando o corte cerebral dos grupos estudados. . As linhas transversais representam 5

<p>μm C = Controle. HD=Hidrocefálico derivado. HA= Hidrocefálico tratado com água destilada. HDA= Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. HQp= Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. HQg= Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. HDQp= Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. HDQg= Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. Houve diferença significativa na comparação entre os grupos C X HN, HN x HDA, HNT x HDQp, HN x HQg, HN x HDQg.</p>	59
<p>Figura 19: Gráfico representando a densidade celular de caspase-3 em mm^2 entre os grupos estudados. As barras transversais superiores ligando dois grupos representam a diferença significativa entre os grupos.</p>	60
<p>Figura 20: Cortes microscópicos corados, visualizados em objetiva de 10x com GFAP na matriz germinativa dos animais dos grupos estudados. As linhas transversais representam 5 μm C: Controle. HD=Hidrocefálico derivado. HA= Hidrocefálico tratado com água destilada. HDA: Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. HQp: Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. HQg: Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. HDQp= Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. HDQg: Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. Houve diferença significativa na comparação entre os grupos C x HDQp e HDQp x HQg.....</p>	61
<p>Figura 21: Avaliação estatística da densidade de astrócitos reativos no corpo caloso dos animais estudados através da avaliação por GFAP. Houve diferença significativa na comparação dos grupos C x HN; C x HDQp e HDQp x HQg, conforme apresentado pelas barras transversais contínuas, pontilhadas e tracejadas acima.</p>	62
<p>Figura 22: Imagens demonstrativas das lâminas coradas por GFAP, visualizadas em objetiva de 10x do córtex cerebral entre os grupos estudados. . As linhas transversais representam 5 μm C: Controle. HD: Hidrocefálico derivado. HA= Hidrocefálico tratado com água destilada. HDA: Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. HQp: Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. HQg: Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. HDQp: Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. HDQg: Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados.</p>	63
<p>Figura 23: Gráfico representativo da densidade de astrócitos reativos encontrados no córtex cerebral dos animais estudados. Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos.</p>	64
<p>Figura 24: Figuras demonstrativas de lâminas de imunoistoquímica da matriz germinativa coradas pelo GFAP, visualizadas em objetiva de 10x. As linhas transversais representam 5 μm C: Controle. HD: Hidrocefálico derivado. HA= Hidrocefálico tratado com água destilada. HDA: Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. HQp: Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. HQg: Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. HDQp: Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. HDQg: Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC.</p>	65
<p>Figura 25: Gráfico do escore de astrócitos reativos entre os grupos estudados. 0: ausência de astrócitos reativos; 1: astrócitos reativos com prolongamentos finos e delicados e 2: astrócitos reativos com prolongamentos grossos. Não houve alteração significativa entre os grupos estudados.</p>	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetro
b-amiloide	Beta amiloide
AA	Ácido ascórbico
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> (fator neurotrófico derivado do cérebro)
BHE	Barreira hematoencefálica
Ca ⁺⁺	Cálcio
CC	Corpo caloso
Cd	Cádmio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
Cl ⁻	Cloro
Cm	Centímetros
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DVSC	Derivação ventrículo-subcutânea
EO	Estresse oxidativo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
g	Gramas
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> (proteína glial fibrilar ácida)
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCO ₃	Bicarbonato
HD	Hidrocefálico derivado
Hg	Mercúrio
HIP	Hemorragia intraventricular prematuridade
HNT	Hidrocefálico não tratado
HA	Hidrocefálico tratado com água destilada
HAD	Hidrocefálico tratado com água destilada + derivação
HQg	Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem
HQgD	Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem + derivação
HQp	Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal
HQpD	Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal + derivação

IGF	<i>Insulin like growth factor</i> (Fator de crescimento semelhante à insulina)
K ⁺	Potássio
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i> (Célula de adesão à molécula L1)
LCR	Líquido cefalorraquidiano
mg	Miligrama
Mg ⁺⁺	Magnésio
MG	Matriz germinativa
ml	Mililitros
Na ⁺	Sódio
O ₂	Oxigênio
OH	Radicais hidroxila
ON	Óxido nítrico
Pb	Chumbo
PC	Plexo coroide
pH	Potencial de hidrogênese
P	Período
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1.	Líquido cefalorradiano.....	18
2.2.	Hidrocefalia	20
2.3.	Estresse Oxidativo	21
2.4.	Quercetina.....	23
3.	JUSTIFICATIVA	26
4.	OBJETIVOS	28
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
5.1.	Animais.....	30
5.2.	Indução da hidrocefalia.....	30
5.3.	Derivação ventrículo-subcutânea (DVSC)	31
5.4.	Grupos experimentais	34
5.5.	Estudos comportamentais	35
5.6.	Perfusão cerebral e coleta de amostras	35
5.7.	Histoquímica e imunoistoquímica	36
5.8.	Documentação fotográfica.....	37
5.9.	Análise estatística	38
6.	RESULTADOS	40
6.1.	Avaliação do peso corporal.....	40
6.2.	Open field	42
6.3.	Labirinto aquático de Morris (<i>water maze</i>)	43
6.4.	Análise macroscópica	46
6.5.	Avaliações histológicas.....	46
6.5.1.	Coloração com hematoxilina e eosina (HE).....	46
6.5.2.	Coloração com solocromo cianina (SC).....	52
6.6.	Avaliações imunoistoquímicas	54
6.6.1.	Ki-67.....	54
6.6.2.	Caspase-3.....	56
6.6.3.	GFAP.....	60
7.	DISCUSSÃO.....	68
8.	CONCLUSÃO.....	75
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A hidrocefalia pode ser definida como aumento da quantidade de líquido cefalorraquidiano (LCR), nas cavidades ventriculares ou espaço subaracnóideo, gerando hipertensão intracraniana. O desequilíbrio entre a produção e absorção de LCR leva a dilatação ventricular e consequentes distorções no parênquima cerebral, comprimindo os hemisférios contra a superfície interna do crânio (DEL BIGIO., 2010). A primeira estrutura afetada é o epêndima ventricular, que sofre compressão e estiramento, sendo destruída em pontos isolados ou até mesmo, totalmente rompida (DEL BIGIO *et al.*, 1997). Outra estrutura lesionada é a substância branca, que nos casos mais avançados de dilatação ventricular pode também perder mielina.

Um avanço significativo e determinante na história do tratamento da hidrocefalia foi a introdução de válvulas de drenagem unidirecionais, com o objetivo de derivar o excesso de líquido dos ventrículos cerebrais para outras cavidades corporais, anulando a base fisiopatológica da hipertensão intracraniana. Este avanço promoveu uma marcante diminuição da mortalidade e da morbidade em crianças com hidrocefalia (JUCÁ *et al.*, 2002).

O estresse oxidativo (EO) ocorre na hidrocefalia, devido a agressão provocada ao parênquima cerebral pelas forças de compressão, estiramento e consequentemente isquemia do tecido cerebral. Essa ação leva a lesão tecidual, com produção de radicais livres, predominantemente através da peroxidação lipídica, que tem um efeito tóxico nas paredes dos vasos arteriais cerebrais. O EO é uma condição biológica na qual ocorre o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam e/ou as reparem. No entanto, todos os organismos possuem um ambiente intracelular de natureza redutora, para que haja equilíbrio entre as moléculas oxidadas e reduzidas, mantendo assim as enzimas as custas de energia metabólica.

A neuroproteção é uma intervenção, não necessariamente farmacológica, cujo objetivo é evitar danos as células neurais ou quando já lesionadas, evitar a progressão da lesão. A quercetina atua como neuroprotetora diretamente nos mecanismos intracelulares da cascata isquêmica, visando o resgate da área de hipoperfusão, ainda viável, circunjacente ao infarto. Portanto o estudo dos efeitos neuroprotetores da quercetina na hidrocefalia é de extrema importância podendo significar um novo tratamento para a enfermidade.

REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Líquido cefalorradiano

O líquido cefalorraquidiano é produzido nos plexos coróides (PC), estruturas aderidas ao epêndima dos ventrículos. O PC existe em todos os quatro ventrículos, mas a maior parte do LCR é sintetizada no PC dos ventrículos laterais, uma vez que este apresenta o maior comprimento, sendo sua extensão dos cornos occipitais até a região do forâmen de Monro na entrada do terceiro ventrículo. O LCR sai dos ventrículos laterais através dos forâmens intraventriculares ou de Monro até o terceiro ventrículo, após passa através do aqueduto cerebral ou de Sylvius, em direção ao quarto ventrículo. Sai do quarto ventrículo pelos forâmens ou fissuras de Luschka (laterais) e Magendie (medial). O LCR circula no espaço subaracnóideo ao redor do cérebro e medula espinhal até chegar nas granulações aracnóides, projeções da membrana aracnoide dentro do sistema venoso adjacente ao seio sagital superior no vértex do crânio, onde é absorvido (Figura 1). O LCR sai do espaço subaracnóideo (devido a pressão dependente de volume) para o sangue pelas granulações aracnóides, e dentro do sistema linfático pela lâmina cribiforme ou via raízes dos nervos espinhais. A absorção de LCR do sistema nervoso central depende da postura, diferença de pressão e fisiopatologia da hidrocefalia (DAVSON e SEGAL., 1996); (BATEMAN e BROWN, 2012; BATEMAN e SIDDIQUE, 2014; HLADKY e BARRAND, 2014).

Figura 1 – Circulação liquórica

Figura 1: Imagem demonstrativa da circulação liquórica, mostrando o trajeto do LCR nos ventrículos. **1-**Plexo corioide dos ventrículos laterais, evidenciando pelas setas a produção e passagem pelo forame intraventricular ou de Monro seguido pela passagem pelo aqueduto cerebral. **2-** Mostrando a passagem do LCR pelos forâmens laterais ou de Luschka e medial ou de Magendie. **3-**O LCR depois de passar pela região medular ascende novamente até o crânio onde começa a ser reabsorvido na região da lâmina cribiforme e **4-**nas granulações aracnóides localizadas próximo ao seio venoso.

Fonte: *Univers des connaissances, Paris, France, 2017*. Tradução no livro *Anatomia Humana 7ª edição*, editora Manole.

Uma quantidade de líquido pode vir através da barreira hematoencefálica para o espaço extracelular cerebral por difusão (MOKGOKONG *et al.*, 2014). O LCR é composto predominantemente de sódio (Na^+), cloro (Cl^-), bicarbonato (HCO_3^-) e em menor quantidade de potássio (K^+), magnésio (Mg^{++}), cálcio (Ca^{++}); algumas vitaminas, (ex., folato, ácido ascórbico, tiamina e vitamina B6); peptídeos e proteínas, transferidas ativamente do sangue para o LCR (ex., leptina) ou sintetizada no plexo corioide (ex., fator de crescimento dependente de insulina, fator neurotrófico derivado do cérebro) e transferidas ao LCR (SPECTOR e JOHANSON., 2013).

Uma pequena quantidade de proteínas plasmáticas difunde-se do plasma para o LCR (ex., albumina). Diferente do plasma, (7 g proteínas/100 ml) ou líquido linfático, (2 g proteínas/100 ml), o LCR tem aproximadamente 0.025 g proteínas/ 100 ml, predominantemente albumina. Quando o LCR secreta algum sal pelo plexo coroide, moléculas de água são arrastadas para manter a osmolaridade (SPECTOR *et al.*, 2015).

O fluxo de LCR tem sido muito estudado nos últimos séculos. Neurocirurgiões e neurologistas compreendem bem as alterações anatômicas e os aspectos fisiológicos por causa das consequências da obstrução do fluxo ventricular, déficit de absorção ou hiperprodução líquórica (ex., hiperplasia de plexo coroide ou papiloma) que causam hidrocefalia (TISELL, 2005) (WARF *et al.*, 2012; BATEMAN e SIDDIQUE, 2014; SPECTOR *et al.*, 2015). Para melhorar a hidrocefalia, em alguns casos, cirurgiões neurológicos coagulam ambos os plexos coroides dos ventrículos laterais para diminuir a produção de LCR (aproximadamente 50%), implantam um sistema de derivação, e realizam procedimento cirúrgico para facilitar a circulação líquórica ou retirar o excesso de LCR não absorvido dos ventrículos.

2.2. Hidrocefalia

Hidrocefalia é caracterizada por um aumento inicial da pressão intraventricular, resultando na dilatação patológica dos ventrículos cerebrais com o acúmulo de LCR. Entretanto a pressão pode ser leve, moderada ou grave, o balanço entre a produção de LCR, fluxo, e absorção é perdido na hidrocefalia.

A causa da hidrocefalia varia, porém, duas condições são utilizadas para facilitar a classificação, comunicante ou não obstrutiva; e não comunicante ou obstrutiva. São diferenciadas pela preservação da anatomia ventricular e fluxo de LCR. Na hidrocefalia comunicante, como o próprio nome sugere, não há bloqueio de fluxo dentro do sistema ventricular ou dentro do espaço subaracnóideo, e o acúmulo de LCR ocorre devido a absorção inadequada de LCR. Na hidrocefalia não comunicante ou obstrutiva, ocorre um acúmulo patológico de LCR devido ao impedimento do fluxo de LCR em algum local do sistema ventricular dificultando o fluxo do LCR. Um exemplo é a estenose de aqueduto que causa dilatação do terceiro ventrículo e dos ventrículos laterais. Esta distinção é fundamental para a diferenciação entre as causas e ajuda no processo de decisão do tratamento e prognóstico da hidrocefalia.

Causas congênicas de hidrocefalia incluem malformação de Chiari, estenose de aqueduto primária, cistos intraventriculares ou massas, hemorragia da matriz germinativa ou

infecção intrauterina, cisto de Dandy-Walker e hidrocefalia ligada ao cromossomo X (alteração do L1CAM). A maioria dos casos de hidrocefalia congênita apresenta-se ao nascimento ou o mais precoce possível, porém a grande maioria é extremamente difícil definir a causa devido a variabilidade regional e genética e uma classificação inconsistente. Como por exemplo, hidrocefalia infantil pós-hemorragica (HIP), uma condição altamente associada à prematuridade, é comumente designada como congênita em alguns estudos e adquirida em outros. A hemorragia na HIP, inicialmente causa um bloqueio no sistema ventricular e hidrocefalia obstrutiva, enquanto o coágulo é reabsorvido no espaço subaracnóideo, onde normalmente o LCR é absorvido, o processo inflamatório atrapalha a absorção de LCR e causa uma hidrocefalia comunicante.

2.3. Estresse Oxidativo

Radicais superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) radicais hidroxila (OH) e oxigênio (O_2) são definidos como espécies reativas de oxigênio (EROs); são resultado de produtos do metabolismo biológico (SATO *et al.*, 2013); (NAVARRO-YEPES *et al.*, 2014). Processos como fosforilação de proteínas, ativação de vários fatores transcritores, apoptose, imunidade e diferenciação celular. (RAJENDRAN *et al.*, 2014). Se a produção de EROs aumenta, ocorrem efeitos prejudiciais na estrutura celular, tais como nas proteínas, lipídios, e ácidos nucleicos (WU *et al.*, 2013). Existem evidências na literatura demonstrando que o estresse oxidativo pode ser o responsável, em diferentes graus de importância, no desenvolvimento ou progressão de diversas doenças (ex., câncer, diabetes, doenças metabólicas, aterosclerose e doenças cardiovasculares (TANIYAMA e GRIENDLING, 2003).

Os EROs são produzidos principalmente pelas mitocôndrias. Depois de formados estão envolvidos em uma gama de reações que formam peróxido de hidrogênio, radicais hidroxilas, peróxido nítrico, ácido hipocloroso e outros. O peróxido de hidrogênio é produzido pela oxidação de múltiplas enzimas, ou seja, oxidação de aminoácidos e da xantina. O radical hidroxila, radical mais reativo de todos os radicais livres é gerado pela reação de oxigênio com peróxido de hidrogênio, com o ferro ou cobre, como uma reação catalisadora (GENESTRA., 2007; KUMAR e PANDEY., 2015). Radical óxido nítrico, que exerce uma importante função fisiológica, é sintetizado pela oxidação da arginina para citrulina pela óxido nítrico sintase. Mesmo reações não enzimáticas podem ser responsáveis pela produção de radicais livres, ou seja, quando o oxigênio reage com componentes orgânicos ou quando células são expostas a

radiação ionizante. Produção de radicais livres não enzimáticos podem ocorrer também durante a respiração mitocondrial.

Radicais livres são gerados de duas maneiras, endógeno ou exógeno. Ativação imunológica celular, inflamação, isquemia, infecção, câncer, excesso de exercício, estresse mental e envelhecimento são os responsáveis endógenos pela produção de radicais livres. A produção exógena de radicais livres pode ocorrer como um resultado a exposição ambiental a poluentes, metais pesados (Cd: cádmio, Hg: mercúrio, Pb: chumbo e Fe: ferro), certas drogas (ciclosporinas, tacrolimus, gentamicina e bleomicina), solventes químicos, fumaça de cigarro, álcool e radiação. Quando esses componentes exógenos penetram o corpo, são degradados, ou metalizados, e radicais livres são produzidos como subprodutos.

O cérebro é susceptível ao dano oxidativo em função da alta utilização de oxigênio, e dos altos níveis de lipídios não saturados e metais de transição como ferro, além, dos mecanismos deficientes em defesa antioxidativa (REITER., 1995). Além disso, EROs e peroxidação lipídica têm sido implicadas na patogênese de desordens neurológicas incluindo trauma cerebral, isquemia e doenças neurodegenerativas (HALLIWELL., 1992). Assim, agentes farmacológicos são capazes de eliminar radicais livres e/ou inibir peroxidação lipídica, e, desta maneira, proteger neurônios de injúria oxidativa podendo prover completo uso na prevenção ou tratamento de desordens neurodegenerativas causadas por estresse oxidativo.

O EO está relacionado a diversas doenças neurológicas (Ex., Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, depressão e perda de memória) (HALLIWELL., 2001). Na doença de Alzheimer, diversos experimentos e pesquisas clínicas demonstraram que o dano oxidativo exerce uma importante função na perda neuronal e na progressão da demência. O b-amiloide, um peptídeo tóxico encontrado no cérebro de pacientes com doença de alzheimer, é produzido pela ação de radicais livres e é conhecido por ser responsável pelo menos em parte pela neurodegeneração observada durante o desenvolvimento e progresso da doença (BUTTERFIELD., 2002).

Isquemia cerebral global foi induzida em camundongos pelas oclusões direita e esquerda das artérias carótidas por 10 minutos seguidas de reperfusão em 24 horas. Ensaio com TBARS (substância reativa ácida tiobarbitúrica) mitocondrial foi empregado como índice de estresse oxidativo. Os efeitos protetores da quercetina foram acompanhados por acentuada diminuição de TBARS mitocondrial, sugerindo que administrada antes de isquemia cerebral poderiam varrer EROs e, conseqüentemente, atenuar a isquemia cerebral global e dano cerebral induzido por reperfusão (GUPTA *et al.*, 2003).

2.4. Quercetina

A quercetina é um flavonoide natural que possui propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiviral, anti-histamínicas e antioxidantes. Tem atividade protetora cardiovascular, reduzindo o risco de morte por doenças coronarianas e diminuindo a incidência de enfarte do miocárdio. Entre suas principais ações, destaca-se o seu poder de remover os radicais livres, exercendo um papel citoprotetor em situações de risco de dano celular. A quercetina demonstrou inibir *in vitro* a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) por macrófagos e reduzir a citotoxicidade da LDL oxidada.

É o mais abundante flavonoide presente na dieta humana, representa cerca de 95% do total dos flavonoides ingeridos (NIJVELDT *et al.*, 2001). O seu consumo diário estimado varia entre 50mg e 500mg diários (DESCHNER *et al.*, 1991). Está presente nos vegetais e frutas, sendo encontrado em altas concentrações nas maçãs, cebolas, chá, vinho tinto e brócolis. É extraído com muita facilidade, pois encontra-se em grande quantidade.

O efeito protetor de quercetina foi superior ao da vitamina C, ao prevenir o efeito de redução de glutathione, e proteger o cérebro do estresse oxidativo induzido por neurotoxicidade devido às propriedades estruturais e benefícios fisiológicos (HEO e LEE., 2004). A quercetina inibe as enzimas cicloxigenase e lipoxigenase, o que reduz a produção dos principais mediadores inflamatórios: prostaglandinas e leucotrienos, a produção de histamina, estabilizando os basófilos e os mastócitos, o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes, na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídeos).

Muitos estudos relatam que os flavonoides na sua forma livre ou glicosilada são absorvidos no trato gastrointestinal e metabolizados em glucoronidato ou sulfato conjugado. A quercetina é completamente convertida em conjugados metilados no plasma, após sua administração, tanto em ratos quanto em seres humanos. A quercetina é absorvida na microflora intestinal e excretada na bile e urina como glucoronidato e sulfato conjugado em até 48 h. Posteriormente, é degradada pelas bactérias intestinais em ácido fenólico, ácido 3-hidroxifenilacético e ácido 3,4-dihidroxifenilacético dentro do anel B. (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Como a permeabilidade cerebral é controlada por características psicoquímicas como hidrofobicidade ou lipofilicidade, a quercetina pode entrar em regiões cerebrais beneficiando-

se de funções antioxidantes e biológicas, protegendo da citotoxicidade induzida por peróxido de hidrogênio.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

A existem várias causas de hidrocefalia, o estresse oxidativo tem um papel importante na fisiopatologia da hidrocefalia em todas elas. A utilização de medicações que diminuam ou impeçam a cascata oxidativa podem melhorar os sintomas da hidrocefalia, principalmente em pacientes que não apresentam condição neurológica favorável para implantação da derivação ventrículo-peritoneal ou recuperar as condições neurológicas dos pacientes operados de derivação ventricular. Portanto a utilização de drogas neuroprotetoras, como a quercetina, pode auxiliar na redução de danos teciduais e até mesmo minimizar as consequências da hidrocefalia.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos neuroprotetores da quercetina na hidrocefalia experimental em ratos Wistar jovens, em conjunto com a derivação ventricular ou como tratamento isolado, através de testes comportamentais, evolução clínica, divisão celular, incidência de lesão glial, taxa de apoptose e dilatação ventricular.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Todos os procedimentos envolvendo os animais estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo comitê local realizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FMRP-USP) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), protocolo n°32/2016. Todos os esforços foram feitos a fim de minimizar o sofrimento e a quantidade de animais usados nesta pesquisa.

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 pela rata-mãe e 8 a 10 filhotes, transportados em uma única caixa alojamento no dia do nascimento para o Biotério da Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP. Os animais permaneceram no biotério local durante os 21 dias de experimento, sendo os sete primeiros dias para cumprir o período de habituação. Durante a permanência dos animais no biotério, a dieta padrão de laboratório para roedores e água foi oferecida *ad libitum* às mães. Os filhotes em fase de desmame também tinham acesso à dieta e à água.

5.2. Indução da hidrocefalia

Com sete dias de idade, os filhotes foram escolhidos aleatoriamente e submetidos à indução da hidrocefalia pelo método da injeção intracisternal de caulim, ou mantidos sem intervenção. Cada animal era posicionado por um auxiliar, que segurava a cabeça do animal com uma mão e o corpo com a outra, flexionando o pescoço do animal, deixando livre a região cervical dorsal (Figura 2). Era identificado o espaço entre a margem posterior do forame magno, no osso occipital, e a borda cranial do arco dorsal da primeira vértebra cervical. Com uma agulha odontológica Mise 0,3 de bisel curto, foi realizada uma punção suboccipital e injeção percutânea lenta de 0,04 ml de uma suspensão de caulim (Merck®) a 15% em água destilada, esterilizada em autoclave. A seguir, os animais eram recolocados em sua caixa alojamento de origem, retornando ao biotério.

Figura 2 - Indução de hidrocefalia

Figura 2: (A) Indução da hidrocefalia: o auxiliar posiciona o animal e o pesquisador realiza a injeção percutânea na cisterna magna com caolim 15%. (B) Animal com dez dias de vida, apresentando a macrocrania em decorrência da evolução da hidrocefalia.

Fonte: acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância (2016).

5.3. Derivação ventrículo-subcutânea (DVSC)

Com 7 dias após a indução da hidrocefalia com caolim. Os animais foram anestesiados com Isoflurano (BioChimo®) 10% com oxigenioterapia contínua, seguidos da administração de Cefalotina 50mg/kg para profilaxia infecciosa pré-operatória, degermação da cabeça, pescoço e tronco com iodo degermante e pintados com iodo alcoólico. Um corte foi realizado na região craniana próximo a sutura coronal a direita e uma trepanação a frente da sutura coronal direita usando uma broca e um perfurador rotativo, a região dorsal do tronco do animal foi dissecada usando um dissector. A seguir, foi realizada a durotomia e a punção ventricular usando cateter de derivação ventricular. Usando um fio prolene 5.0 o cateter proximal era fixado ao osso. Após revisamos a técnica cirúrgica e o procedimento era realizado o fechamento da pele em plano único com prolene 5.0 (Figura 3). A técnica foi desenvolvida no laboratório de pesquisa, com o detalhamento dos procedimentos publicados recentemente (SANTOS *et al.*, 2016). A avaliação pós-cirúrgica pode ser observada na figura 4.

Os animais permaneciam em uma caixa aquecida a 36° C e em observação durante 60 minutos. Quando acordados e deambulando adequadamente eram devolvidos à mãe para amamentar-se.

Figura 3 – Procedimento cirúrgico – preparação

Figura 3: Procedimento cirúrgico. (A) Materiais utilizados durante a cirurgia. (B) Animal com catorze dias de vida em decúbito ventral sob anestesia inalatória. (C) Degermação com iodo tópico degermante. (D) Degermação com iodo alcóolico.

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

Figura 4 – Avaliação pós-cirúrgica

Figura 4: **A:** Cicatriz cirúrgica no vigésimo primeiro dia de estudo; **B:** Cateter utilizado para realizar a DVSC com o guia metálico (seta branca) para manter a angulação de 90°. O guia era retirado antes da implantação do cateter; **C:** A seta branca mostra o acúmulo de líquido no espaço subcutâneo do animal no P21, na visão superior; **D:** A seta branca mostra o acúmulo de líquido, no mesmo animal, na região espaço subcutânea em uma visão lateral.

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

5.4. Grupos experimentais

- **Controle(C):** Animais sem indução da hidrocefalia, sem intervenção cirúrgica ou tratamento medicamentoso;
- **Hidrocefálico não tratado com medicamento:**

Hidrocefálico derivado (HD): Animais com hidrocefalia tratados com DVSC.

Hidrocefálico não derivado (HN): Animais com hidrocefalia sem intervenção cirúrgica ou tratamento medicamentoso.

- **Hidrocefálico tratado com o veículo, água destilada:**

Hidrocefálico derivado (HDA): Animais hidrocefálicos que receberam água destilada peritoneal e DVSC.

Hidrocefálico não derivado (HA): Animais que receberam água destilada intraperitoneal.

- **Tratados com Quercetina por gavagem:**

Hidrocefálico derivado (HDQg): Animais que receberam quercetina por gavagem e DVSC.

Hidrocefálico não derivado (HQg): Animais que receberam quercetina por gavagem.

- **Tratados com Quercetina peritoneal:**

Hidrocefálicos derivados (HDQp): Animais tratados com quercetina intraperitoneal e DVSC.

Hidrocefálicos não derivados (HQp): Animais tratados com quercetina intraperitoneal.

5.5. Estudos comportamentais

Os animais foram pesados diariamente e observados quanto a possíveis alterações clínicas (perda de peso e desidratação, alterações da marcha e da consciência, negligência com a higiene).

Para estudo do desenvolvimento sensoriomotor, o comportamento deambulatório foi avaliado pelo teste de campo aberto (*open field*) a cada 2 dias, ou seja, P6, P8, P10, P12, P14, P16, P18 e P20 a partir do sexto dia após a aplicação da injeção. Cada animal foi observado individualmente em uma arena de acrílico transparente de 60 cm de lado e 45 cm de altura, por 2 minutos, sendo avaliados cuidados de higiene, exploração do ambiente e marcha, de acordo com a escala: 4 = alerta, com exploração e marcha normais; 3 = discretamente letárgico, com atividade reduzida, mas com marcha normal quando estimulado; 2 = cifótico, caminha, mas a marcha tem base alargada, instável ou atáxica; 1 = mal consegue andar, mas ainda se alimenta; 0 = próximo da morte ou eutanasiado. Para a realização deste teste, eram utilizados cronômetros a partir do início dos movimentos. As arenas foram limpas com solução de sabão neutro entre as observações de diferentes ninhadas de animais. E na análise estatística foi realizada a análise da mediana do escore entre os grupos.

Para estudo da memória e aprendizagem espacial, os ratos foram submetidos ao labirinto aquático de Morris. Uma piscina circular (100 cm de diâmetro, 50 cm de altura) e uma plataforma transparente (34 cm de altura, 8 cm de diâmetro e 2 cm abaixo da superfície). A temperatura da água da piscina foi controlada em aproximadamente 22°C. A fase de adaptação foi realizada no oitavo dia pós-indução, na qual os ratos tinham 60 segundos livres para nadar na piscina sem a plataforma, e sua velocidade de natação será observada. A fase de aprendizagem espacial foi realizada nos dias 9 e 14 após a injeção do caulim em 2 turnos no mesmo dia, por um minuto. O tempo limite para o animal alcançar a plataforma e ser considerado um acerto foi de 60 segundos. No final de cada sessão o animal era colocado na plataforma para descanso de 15 segundos, após era recolocado junto à parede da piscina, para iniciar uma nova sessão.

5.6. Perfusão cerebral e coleta de amostras

Os animais de cada grupo foram anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina 10% e xilasina 10% (nas doses de 0,1 mg/100g e 0,05 mg/100g). Posicionados na mesa cirúrgica, em decúbito dorsal, era realizada uma incisão em “Y”, no tórax, das duas

clavículas até o apêndice xifoide, e, no abdome, incisão mediana, xifo-púbica. Com uma agulha 20G marca BD®, foi puncionado a ponta do ventrículo cardíaco esquerdo, introduzindo-a até a raiz da aorta. Iniciada a perfusão cardíaca com solução salina, agora com uma agulha 21G, 25 x 0,80 BD®, 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, seus encéfalos retirados em bloco através de uma craniectomia de vértex. Os encéfalos foram divididos na linha mediana. As metades direitas dos encéfalos foram imersas em uma solução fixadora de paraformaldeído diluído a 3% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3 – 7,4) por 24 horas à temperatura de 40°C, subdividas no plano coronal, em uma porção anterior e outra posterior, tomando-se como referencial o quiasma óptico, sendo posteriormente mantidas em uma nova solução de paraformaldeído 3% fresca, permanecendo nesta solução fixadora por mais 7 dias à mesma temperatura. As metades esquerdas foram guardadas em freezer -80°C para possível análise enzimática.

5.7. Histoquímica e imunoistoquímica

As lâminas histológicas contendo os cortes de amostras foram desidratadas 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 5 µm de espessura e os cortes estendidos em lâminas histológicas.

Para análise histoquímica, as lâminas são 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, são corados com hematoxilina e eosina ou solocromo-cianina (cada amostra foi corada com ambas as colorações). Na coloração feita pelo método hematoxilina e eosina, observou-se a citoarquitetura geral, a distribuição das estruturas e a densidade celular. Os núcleos corados pela hematoxilina, evidenciados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares corados pela eosina, em rosa.

Já com solocromo-cianina, avaliou-se a espessura do CC e o grau de mielinização, sendo essa quantificação realizada através do confronto visual e aplicação de um escore de classificação da intensidade da cor azul mostrando uma tonalidade mais escura de azul em regiões com maior densidade de mielina, bem como uma tonalidade mais clara de azul em regiões com menor densidade de mielina, através do escore de coloração em azul, onde: 0: tonalidade fraca em azul; 1: tonalidade média em azul; e 2: tonalidade forte em azul.

Para o estudo imunoistoquímico, as lâminas foram mantidas em estufa a 60° C por 30 minutos e desparafinizadas em banhos sequenciais de xilol e álcool. Foram realizados estudos imunoistoquímicos para GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) para avaliação da reação astrocitária, através da distribuição e do aspecto morfológico da astróglia no CC, MG e córtex cerebral); Ki-67 para avaliação da matriz germinativa no ângulo externo do ventrículo lateral, através da quantificação e cálculo da densidade de células marcadas. Caspase-3 para avaliação do apoptose celular no CC e no córtex cerebral.

Após recuperação antigênica, quando indicado, pelo método de acidificação e aquecimento (citrato de sódio em panela elétrica), o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol foi realizado. 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 (1,5: 3000) (DAKO Z0334, Dinamarca), anti-caspase-3 (1:40) (BioCare Medical, ACR-229) e anti-Ki-67 (1: 40) (Santa Cruz sc-23900). Lavado o anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho - Santa Cruz Biotechnology SC-2040 ou anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology SC-2039) diluído 1:300 em BSA. Após, foram incubados com o 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 silanizadas (*Starfrost*®) para melhor fixação do tecido na lâmina.

5.8. Documentação fotográfica

Para documentação fotográfica das lâminas e contagem de células foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse E 200 MV com sistema de captura digital de imagens (MOTICAN 10), com software dedicado em ambiente Windows MOTIC images plus 2.0.

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 do 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 e córtex dorsal ao ventrículo lateral em objetiva de 10x. As lâminas coradas com solocromo-cianina são fotografadas a região do corpo caloso (objetiva de 10x) e realizada a medição da sua espessura.

Nas lâminas imunomarcadas com GFAP foram fotografados campos demarcados, não sobrepostos, com área mensurada, em toda a extensão do corpo caloso, da matriz germinativa e do córtex dorsal ao ventrículo lateral (objetiva de 10x), nos quais é realizada a contagem dos astrócitos reativos e calculada a densidade dos mesmos. Além disso, é feita a classificação da reação astrogliar, aplicando-se 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. A imunomarcção com caspase-3 foram fotografadas (com objetiva de 40x) na região do corpo caloso e do córtex cerebral dorsal ao ventrículo lateral. Já as lâminas imunomarcadas com Ki-67 são fotografadas (objetiva de 40x) apenas na região da matriz germinativa no ângulo externo do ventrículo lateral (área de intensa replicação celular), onde é realizada a contagem das células marcadas em divisão mitótica e as células totais (marcadas e não marcadas), para posterior cálculo da relação de células marcadas/células totais.

5.9. Análise estatística

Foi utilizado o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software In., San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados obtidos nos testes comportamentais, histológicos e imunoistoquímicos foram submetidos a um teste de normalidade e, em seguida, analisados. Testes paramétricos foram utilizados para comparações de grupos com dados normalmente distribuídos (análise de variância - ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey), e testes não-paramétricos foram usados para outras comparações (Kruskall-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn). As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação do peso corporal

Para análise do peso corporal dos nove grupos estudados realizamos dois tipos de comparações entre os grupos: ganho ponderal diário e porcentagem de ganho de peso médio por dia.

A média de peso dos animais controles foi de $50,16 \pm 6,55$ gramas, sendo a maior média de peso entre os grupos. A média de peso do grupo HDQg foi de $39,69 \pm 5,40$ gramas, sendo a menor média entre os grupos. Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos. A média dos animais dos grupos não derivados (HN, HA, HQp, HQg) com exceção do grupo controle foi de $44,32 \pm 1,38$ gramas, enquanto a média dos grupos dos animais que foram submetidos à derivação (HD, HDA, HDQp, HDQg), com exceção do grupo controle, foi de $41,29 \pm 1,11$ gramas, não apresentando alteração significativa quando comparadas entre si e entre o grupo controle. A média de peso dos grupos dos animais tratados com quercetina (HQp, HDQp, HQg, HDQg) foi de $42,8 \pm 2,43$ gramas, enquanto a média de peso dos grupos dos animais não tratados com quercetina (HN, HD, HA, HDA) com exceção do grupo controle, foi de $42,8 \pm 1,82$ gramas, não havendo diferença significativa entre os grupos com e sem quercetina (Figura 5).

Figura 5 – Peso ponderal

Figura 5: Gráficos representando a avaliação estatística da média do peso corporal dos animais em gramas. **A:** Média de peso final entre os grupos estudados; **B:** Ganho ponderal médio diário em gramas por dia, os círculos escuros representam o ganho médio diário de cada animal e as barras transversais a média diária dos grupos. Não houve diferença significativa entre os grupos.

O grupo controle apresentou média de ganho de peso 4,19g/dia, os animais do grupo HN apresentaram uma média de 3,58g/dia, os animais do grupo HD apresentaram uma média de 3,04g/dia, os animais do grupo HA apresentaram uma média de 3,12g/dia, os animais do grupo HDA apresentaram uma média de 2,74g/dia, os animais do grupo HQp apresentaram uma média de 3,44g/dia, os animais do grupo HDQp apresentaram uma média de 2,97g/dia, os animais do grupo HQg apresentaram uma média de 3,31g/dia e os animais do grupo HDQg apresentaram uma média de 2,65g/dia. A média dos animais dos grupos não derivados (HN, HA, HQp, HQg) com exceção do grupo controle foi de 3,36g/dia. enquanto a média dos grupos dos animais que foram submetidos à derivação (HD, HDA, HDQp, HDQg), com exceção do grupo controle, foi de 2,85g/dia, não apresentando diferença significativa quando comparadas entre si e entre o grupo controle. A média de peso dos grupos dos animais tratados com quercetina (HQp, HDQp, HQg, HDQg) foi de 3,09g/dia, enquanto a média de peso dos grupos dos animais não tratados com quercetina (HN, HD, HA, HDA), com exceção do grupo controle, foi de 3,12g/dia.

A média de peso do grupo controle no P0 foi de $16,56 \pm 0,84$ e no P21 de $107,37 \pm 2,12$. A média de peso do grupo HN no P0 foi de $18,31 \pm 0,49$ e no P21 de $96,66 \pm 1,25$. A média de peso do grupo HD no P0 foi de $18,88 \pm 0,19$ e no P21 de $86,18 \pm 0,96$. A média de peso do grupo HA no P0 foi de $17,9 \pm 0,1$ e no P21 de $86,75 \pm 1,1$. A média de peso do grupo HDA no P0 foi de $20,92 \pm 1,41$ g e no P21 de $82 \pm 1,21$. A média de peso do grupo HQp no P0 foi de $18,31 \pm 0,05$ e no P21 de $94,18 \pm 2,1$. A média de peso do grupo HDQp no P0 foi de $19,34 \pm 0,06$ e no P21 de $84,56 \pm 1,65$. A média de peso do grupo HQg no P0 foi de $18,28 \pm 0,13$ e no P21 de $90,94 \pm 1,35$. A media de peso do grupo HDQ no P0 foi de $19,44 \pm 0,21$ e no P21 de $78,2 \pm 0,95$ (Figura 6).

Figura 6 – Média ponderal diária

Figura 6: Análise da média diária de peso durante todos os dias do experimento P0 a P21, entre os grupos estudados, as linhas significam o ganho médio diário de peso entre os grupos estudados.

6.2. Open field

No P6 apenas o grupo controle apresentou uma mediana de escore 2, os outros grupos apresentaram uma mediana de 1. Todos os grupos apresentaram escore 2 no P8. Os grupos C, HN, HD, HA, HDA, HQg e HDQg apresentaram no P10 escore de 3, enquanto os grupos HQp e HDQp apresentaram escore de 2. Os grupos C, HN, HD, HA, HDA apresentaram no P12 um escore de 4, escore máximo, e os animais dos grupos HQp, HDQp, HQg e HDQg apresentaram escore de 3. No P14 todos os grupos apresentaram escore de 4 com exceção do grupo HDQp que apresentou escore de 3. No P16, P18 e P20 todos os animais apresentaram escore de 4; não houve diferença entre os grupos. No P6 apenas o grupo controle apresentou uma mediana de

escore 2, os outros grupos apresentaram uma mediana de 1. Todos os grupos apresentaram escore 2 no P8. Os grupos C, HN, HD, HA, HDA, HQg e HDQg apresentaram no P10 escore de 3, enquanto os grupos HQp e HDQp apresentaram escore de 2. Os grupos C, HN, HD, HA, HDA apresentaram no P12 um escore de 4, escore máximo, e os animais dos grupos HQp, HDQp, HQg e HDQg apresentaram escore de 3. No P14 todos os grupos apresentaram escore de 4 com exceção do grupo HDQp que apresentou escore de 3. No P16, P18 e P20 todos os animais apresentaram escore de 4; não houve diferença entre os grupos (Figura 7).

Figura 7 – Mediana do teste de campo aberto

Figura 7: Avaliação da mediana do escore de marcha através do teste de comportamento de campo aberto (*open field*). A análise estatística não evidenciou diferença significativa na comparação entre os grupos.

6.3. Labirinto aquático de Morris (*water maze*)

A avaliação do tempo necessário para que cada animal atingisse a plataforma realizada no primeiro dia após o treinamento P10 não evidenciou diferenças significativas, sendo que o grupo controle demorou em média 48,6 segundos. O grupo HN demorou em média 44,8 segundos. O grupo HD demorou em média 55 segundos. O grupo HA demorou em média 39 segundos. O grupo HDA demorou em média 47,4 segundos. O grupo HQp demorou em média 40,5 segundos. O grupo HDQp demorou em média 43,4 segundos. O grupo HQg demorou em média 38,8 segundos. O grupo HDQg demorou em média 54,8 segundos.

No período da tarde o tempo necessário para que cada animal atingisse a plataforma diminuiu, sendo o tempo médio do grupo controle de 35,8 segundos, apresentando uma melhora média de 9 segundos comparados com o período da manhã. O grupo HN demorou em média

46,4 segundos, apresentando uma melhora de 2,2 segundos comparados com o período da manhã. O grupo HD demorou em média 53,3 segundos, apresentando uma melhora de 1,7 segundos comparados com o período da manhã. O grupo HA demorou em média 43,2 segundos, apresentando uma piora do tempo de 4,25 segundos comparados com o período da manhã. O grupo HDA demorou em média 49 segundos, apresentando uma piora do tempo médio de 1,6 segundos. O grupo HQp demorou em média 37,2 segundos, apresentando uma melhora de 3,2 segundos comparados com o período da manhã. O grupo HDQp demorou em média 43,9 segundos, apresentando uma piora do tempo médio de 0,1 segundos. O grupo HQg demorou em média 39,6 segundos, apresentando uma piora do tempo médio de 0,8 segundos. O grupo HDQg demorou em média 50,6 segundos, apresentando uma melhora de 4,1 segundos.

A avaliação do tempo necessário para que cada animal atingisse a plataforma realizada no P14, quatro dias após o primeiro teste, não evidenciou diferenças significativas, sendo que o grupo controle demorou em média 27,9 segundos, 16,9 segundos melhor que a média do P10 pela manhã. O grupo HN demorou em média 35,1 segundos, 13,5 segundos melhor que a média de P10 pela manhã. O grupo HD demorou em média 46,9 segundos, 8,1 segundos melhor que a média de P10 pela manhã. O grupo HA demorou em média 38,7 segundos, 0,3 segundos melhores que a média de P10 pela manhã.

O grupo HDA demorou em média 36,3 segundos, 11,1 segundos melhor que a média de P10 pela manhã. O grupo HQp demorou em média 30,4 segundos, 10,1 segundos melhor que a média de P10 pela manhã. O grupo HDQp demorou em média 29,7 segundos, 13,6 segundos melhor que a média de P10 pela manhã. O grupo HQg demorou em média 35 segundos, 3,8 segundos melhor que a média de P10 pela manhã. O grupo HDQg demorou em média 38 segundos, 16,8 segundos melhor que a média de P10 pela manhã. No período da tarde o tempo médio para que os animais atingissem a plataforma diminuiu na maioria dos grupos. Apresentando alteração significativa quando comparados os grupos C x HD (-56,49 a -5,849); C x HDA (-52,27 a -2,844); C x HDQg (-48,59 a 0,4222); HD x HQp (5,664 a 58,09); HQp x HDQg (-50,23 a 0,4967). Sendo que a média de tempo do grupo controle foi de 21,1 segundos, 6,8 segundos menos que o período da manhã no P14. O grupo HN apresentou uma média de tempo de 39,6 segundos, sendo 4,5 segundos maior que o período da manhã em P14. O grupo HD apresentou uma média de 52,18 segundos, sendo 5,28 segundos maior que o período da manhã em P14. O grupo HA apresentou uma média de 37,9 segundos, sendo 0,8 menor que o período da manhã em P14. O grupo HDA apresentou uma média de 48,7 segundos, sendo 12,4 segundos maior que o período da manhã em P14. O grupo HQp apresentou uma média de 20,3 segundos, 10,1 segundos menor que o período da manhã em P14. O grupo HDA apresentou

uma média de 27,7 segundos, 2 segundos a menos que o período da manhã em P14. O grupo HQg apresentou uma média de tempo de 31,1 segundos, 3,9 segundos a menos que o período da manhã em P14. O grupo HDQg apresentou uma média de tempo de 45,67 segundos, 7,67 segundos a mais que o período da manhã em P14 (Figura 8).

Figura 8 – Labirinto aquático de Morris (water maze)

Figura 8: Gráficos da análise do tempo médio em segundos necessário para que cada animal atingisse a plataforma no decimo dia P10 e no decimo quarto P14 dia de estudo. Sendo **A:** O gráfico do tempo médio necessário para os animais atingirem a plataforma no decimo dia pela manhã. **B:** O gráfico do tempo médio necessário para os animais atingirem a plataforma no decimo dia à tarde. **C:** O gráfico do tempo médio necessário para atingir a plataforma no decimo quarto dia pela manhã e em **D:** O gráfico do tempo médio necessário para que cada animal atingisse a plataforma no décimo quarto dia no período da tarde.

6.4. Análise macroscópica

A análise macroscópica demonstrou que os animais com hidrocefalia não submetidos a DVSC apresentaram maior dilatação ventricular e lesão cortical. A lesão cortical geralmente era bilateral, porém com um hemisfério mais acometido que o outro, evidenciando uma coloração diferenciada, afinamento do córtex cerebral e perda da diferenciação anatômica cerebral. Houveram diferentes graus de hidrocefalia. Os animais dos grupos que foram submetidos a DVSC apresentaram melhora significativa do tamanho ventricular e da preservação do parênquima cerebral.

6.5. Avaliações histológicas

6.5.1. Coloração com hematoxilina e eosina (HE)

- **Matriz germinativa:**

A região da matriz germinativa, localizada no ângulo externo dos ventrículos laterais, apresenta-se, nos controles, intensamente celular, de núcleo intensamente corado pela hematoxilina. Nos animais do grupo HN, a matriz germinativa perdeu grande parte de suas células, observando que há diferenças na quantidade, forma e distribuição de células entre os grupos C e HN. Os animais dos grupos que receberam a quercetina e ou a DVSC apresentaram maior densidade celular, distribuição e quantidade de células na matriz germinativa; Os animais dos grupos que não receberam nenhum tratamento (HN), o tratado com diluente água destilada (HA) e o tratado com derivação e água destilada (HDA) foram os que apresentaram a matriz germinativa com a menor quantidade de celular, densidade, pior formato e distribuição, quando comparados com os outros grupos (Figura 9).

Figura 9 – Histologia – matriz germinativa

Figura 9: Cortes histológicos corados por HE, visualizados na objetiva de 10X na região da matriz germinativa, as linhas transversais representam 10µm. **C** = Controle. **HD** = Hidrocefálico derivado. **HA**= Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA** = Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp** = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp** = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

- **Corpo caloso**

Nos animais do grupo C, o corpo caloso é espesso, contínuo, com maior densidade celular e a cavidade ventricular, é muito pequena. Nos animais do grupo HN há um espandimento do corpo caloso, com diminuição da densidade celular, espessura, perda da sua continuidade e a cavidade ventrículos é muito maior comparada do grupo C. Nos animais do grupo HD, o corpo caloso apresenta diminuição da densidade, diminuição da espessura e a cavidade ventrículos encontra-se dilatada em comparação ao grupo C, porém com dilatação semelhante ao grupo HN. Os animais do grupo HA apresentaram também uma diminuição da espessura do corpo caloso, com seu espandimento, diminuição da densidade e aumento da área ventricular semelhantes aos grupos HD e HN. O grupo HDA apresentou diminuição da densidade celular, espandimento do corpo caloso, porém a espessura do corpo caloso foi maior do que as encontradas nos grupos HD, HN e HA e há também uma melhora da dilatação ventricular, com diminuição do seu tamanho. Os animais dos grupos HQp e HQg apresentaram resultados semelhantes na espessura do corpo caloso, densidade celular, esgarçamento do corpo caloso e de dilatação ventricular, porém quando comparados com os grupos HDQp e HDQg (que receberam a DVSC), a dilatação ventricular foi maior nos grupos HQp e HQg, a espessura do corpo caloso foi menor, assim como houve uma melhora do esgarçamento do corpo caloso, da densidade celular nos grupos HDQp e HDQg (Figura 10).

Figura 10 – Histologia – Corpo caloso

Figura 10: Cortes histológicos do corpo caloso, visualizados em objetiva de 10x corados em HE. As linhas transversais representam 10 μ m. **C** = Controle. **HD** = Hidrocefálico derivado. **HA** = Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA** = Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp** = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp** = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC

Fonte: Acervo pessoal (2017).

- **Córtex cerebral**

A avaliação do córtex cerebral pela técnica de HE evidenciou que os animais do grupo controle apresentaram todas as seis camadas bem diferenciadas nas lâminas estudadas, enquanto os outros grupos a diferenciação entre as camadas não era tão evidente. Os animais submetidos a DVSC apresentaram uma camada I (camada molecular) maior que os animais não submetidos a cirurgia, porém as demais camadas continuam com dificuldade de diferenciação nas lâminas estudadas. É possível identificar também em algumas lâminas o local de passagem da derivação ventricular pelas camadas do córtex (Figura 11).

Figura 11 – Histologia – Córtex cerebral

Figura 11: Cortes histológicos do córtex cerebral, visualizados em objetiva de 10x, corados em HE. As linhas tracejadas representam 10 µm. **HD** = Hidrocefálico derivado. **HA**=Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA** = Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp** = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp** = Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC.

Fonte: acervo pessoal (2017).

6.5.2. Coloração com solocromo cianina (SC)

Os animais controles exibiram maior espessura do corpo caloso que os outros grupos, apresentando diferença estatística apenas na comparação com o grupo HA (C x HA $p=0,0007$ IC 0,04975 a 0,2991). Os animais que receberam a quercetina como tratamento e a DVSC apresentaram maior média de espessura de corpo caloso que os outros grupos, sendo estatisticamente significativo na comparação com o grupo HA (HDQp x HA $p=0,0264$ IC -0,2313 a -0,00783 e HDQg x HA $p=0,0092$ IC -2,403 a -0,0195).

Em comparação apenas com os animais derivados (HD; HDA; HDQp e HDQg) e os animais não derivados com exceção do grupo controle (HN; HA; HQp e HQg), observou-se que o grupo controle apresentou maior aumento do corpo caloso comparado com o grupo dos animais não derivados, apresentando alteração significativa (C x Não derivados $p=0,0062$ IC 0,2348 a 0,1708). Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos C x derivados e derivados x não derivados (Figura 12).

Figura 12 - Histologia – Solocromo-cianina

Figura 12: Cortes histológicos do corpo caloso, visualizados em objetiva de 10x, corados em solocromo-cianina. As linhas transversais representam 10µm. **C** = Controle. **HD** = Hidrocefálico derivado. **HA**=Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA** = Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp**=Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp** =Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg** = Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. Não houve diferença significativa.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

Figura 13 – Histologia – solocromo cianina

Figura 13: (A) Avaliação da média da espessura do corpo caloso em milímetros entre os grupos estudados; as linhas tracejadas, pontilhadas ou retilhneas mostram alterações significativas entre os grupos e em (B) a avaliação da espessura média do corpo caloso entre os grupos de animais com DVSC e sem DVSC, houve diferença significativa na comparação entre o grupo C e Não derivados.

6.6. Avaliações imunoistoquímicas

6.6.1. Ki-67

O Ki-67 (Antígeno nuclear associado ao ciclo celular) nos animais controles, apresentavam a região da matriz germinativa, no ângulo externo do ventrículo lateral, intensamente celular, com células pequenas, de núcleo basofílico em azul intenso. Verificou-se que a matriz germinativa era mais densa de células, os grupos HDQg e HDQp apresentando uma densidade celular de Ki67 na matriz germinativa maior e semelhante respectivamente que o grupo controle, porém sem alteração significativa (C x HDQg: $p > 0,9999$; IC: -2,651 a 2,651 e C x HDQp: $p > 0,9999$; IC: -2,961 a 2,206). Os outros grupos apresentaram uma densidade celular na matriz germinativa menor, com menos marcação no núcleo celular e menor marcação de Ki67, sendo o grupo HD o que apresentaram menor marcação nuclear pelo Ki-67 (Figura 14). Não foi observada diferença significativa na contagem de células marcadas pelo Ki-67 entre os quatro grupos (Figura 15).

Figura 14 – Avaliação imunoistoquímica – Ki-67

Figura 14: Avaliação imunoistoquímica KI-67, visualizados em objetiva de 40x. As linhas transversais representam 3µm. **HD:** Hidrocefálico derivado. **HA=**Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA:** Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSG. **HQp:** Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg:** Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp:** Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSG. **HDQg:** Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSG. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

Figura 15 – Análise imunoistoquímica – Ki-67

Figura 15: (A) Avaliação do número de células por mm² dos grupos estudados e em (B) a quantidade de células marcadas pelo anticorpo Ki67 em comparação com o total de celular encontradas por mm². Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos.

6.6.2. Caspase-3

- **Corpo caloso**

Avaliou-se a densidade celular de caspase-3 no corpo caloso. O grupo que mais apresentou células marcadas pela cassasse foi o grupo HDQg e o grupo que menos apresentou células marcadas pelo anticorpo caspase-3 foi o grupo controle, sendo que não houve diferença significativa na comparação entre o grupo C e HDQg (C x HDQg $p=0,3958$ IC -28,1 a 4,994) (Figura 16). A comparação entre os demais grupos também não evidenciou nenhuma diferença significativa (Figura 17).

Figura 16 – Avaliação imunoistoquímica – Caspase-3 – corpo caloso

Figura 16: Gráfico da densidade das células imunomarcadas, em mm², por caspase-3 no corpo caloso dos grupos estudados. Não houve diferença significativa.

Figura 17 – Imunoistoquímica – Caspase-3 – corpo caloso

Figura 17: Cortes microscópicas com anticorpo caspase-3, visualizados com objetiva de 10, com estudo do corpo caloso dos grupos de animais estudados. As linhas transversais representam 5 µm. **C** = Controle. **HD**=Hidrocefálico derivado. **HA**= Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA**= Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp**= Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg**= Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp**= Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg**= Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. Houve diferença significativa na comparação entre os grupos C x HDQg.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

- **Córtex cerebral**

Avaliou-se a densidade celular marcadas com o anticorpo caspase-3 no córtex cerebral dos animais estudados. O grupo que apresentou maior marcação celular de anticorpos foi o HN, enquanto o grupo controle apresentou a menor densidade celular entre os grupos, apresentado diferença significativa quando comparados (C x HN $p < 0,001$ IC -28,45 a -7,55). Houve também diferença significativa na comparação da densidade celular marcadas pela caspase-3 no córtex cerebral entre os grupos HN e HDA (HN x HDA $p = 0,0105$ IC 1,714 a 22,09), entre os grupos HN e HDQp (HN x HDQp $p = 0,0013$ IC 3,714 a 24,09); HN e HQg (HN x HQg $p = 0,0116$ IC 1,614 a 21,99) e HN e HDQg (HN x HDQg $p = 0,0155$ IC 1,314 a 21,69) (Figuras 18 e 19).

Figura 18 – Imunoistoquímica – Caspase-3 -córtex cerebral

Figura 18: Cortes microscópicos corados com anticorpo caspase-3, visualizados em objetiva de 10x, avaliando o corte cerebral dos grupos estudados. . As linhas transversais representam 5 µm **C** = Controle. **HD**=Hidrocefálico derivado. **HA**= Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA**= Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp**= Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg**= Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp**= Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg**= Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. Houve diferença significativa na comparação entre os grupos C X HN, HN x HDA, HNT x HDQp, HN x HQg, HN x HDQg.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

Figura 19 – Análise imunoistoquímica – Caspase-3 – córtex cerebral

Células totais: Caspase-3 Córtex cerebral

Figura 19: Gráfico representando a densidade celular de caspase-3 em mm² entre os grupos estudados. As barras transversais superiores ligando dois grupos representam a diferença significativa entre os grupos.

6.6.3. GFAP

- **Corpo caloso**

A análise do anticorpo proteína acida fibrilar (GFAP) evidenciou maior densidade de células marcadas no corpo caloso dos animais HDQp e HN, apresentando alteração significativa quando comparados com o grupo C (C x HDQp $p=0,0007$ IC -2,118 a -0,371; C x HN $p=0,0176$ IC -1,896 a -0,1039) e na comparação entre os grupos HDQp e HQg (HDQp x HQg $p=0,0343$ IC -1,452 a 0,3406). A comparação entre os outros grupos não houve diferença significativa (Figuras 20 e 21).

Figura 20 – Imunoistoquímica – GFAP – corpo caloso

Figura 20: Cortes microscópicos corados, visualizados em objetiva de 10x com GFAP na matriz germinativa dos animais dos grupos estudados. As linhas transversais representam 5 µm **C:** Controle. **HD**=Hidrocefálico derivado. **HA**= Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA:** Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp:** Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg:** Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp**= Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg:** Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. Houve diferença significativa na comparação entre os grupos C x HDQp e HDQp x HQg.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

Figura 21 - Imunoistoquímica – GFAP – corpo caloso

Figura 21: Avaliação estatística da densidade de astrócitos reativos no corpo caloso dos animais estudados através da avaliação por GFAP. Houve diferença significativa na comparação dos grupos C x HN; C x HDQp e HDQp x HQg, conforme apresentado pelas barras transversais contínuas, pontilhadas e tracejadas acima.

- **Córtex cerebral**

Na avaliação da marcação celular pelo GFAP no córtex cerebral evidenciou-se que o grupo que apresentou maior marcação celular foi o grupo HN seguido pelo grupo HDQp, e o grupo que apresentou menor marcação foi o grupo controle. Porém não houve diferença significativa na comparação entre os grupos estudados (Figuras 22 e 23).

Figura 22 – Imunoistoquímica – GFAP – córtex cerebral

Figura 22: Imagens demonstrativas das lâminas coradas por GFAP, visualizadas em objetiva de 10x do córtex cerebral entre os grupos estudados. . As linhas transversais representam 5 μ m **C:** Controle. **HD:** Hidrocefálico derivado. **HA=** Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA:** Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp:** Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg:** Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp:** Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg:** Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC. Não houve diferença significativa entre os grupos estudados.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

Figura 23 – Imunoistoquímica – GFAP – córtex cerebral

Densidade de astrócitos reativos - córtex cerebral

Figura 23: Gráfico representativo da densidade de astrócitos reativos encontrados no córtex cerebral dos animais estudados. Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos.

- **Matriz germinativa**

A avaliação da marcação celular pelo GFAP na matriz germinativa evidenciou que o grupo que apresentou maior marcação celular foi o grupo HDQp e o grupo que apresentou menor marcação foi o grupo controle. Porém não houve diferença significativa na comparação entre os grupos estudados (Figuras 24 e 25).

Figura 24 – Imunoistoquímica – GFAP – matriz germinativa

Figura 24: Figuras demonstrativas de lâminas de imunoistoquímica da matriz germinativa coradas pelo GFAP, visualizadas em objetiva de 10x. As linhas transversais representam 5 µm **C:** Controle. **HD:** Hidrocefálico derivado. **HA=** Hidrocefálico tratado com água destilada. **HDA:** Hidrocefálico tratado com água destilada e DVSC. **HQp:** Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal. **HQg:** Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem. **HDQp:** Hidrocefálico tratado com quercetina peritoneal e DVSC. **HDQg:** Hidrocefálico tratado com quercetina por gavagem e DVSC.

Fonte: Acervo pessoal (2017).

Figura 25 – Gráfico do escore de astrócitos reativos

Densidade de astrócitos reativos - matriz germinativa

Figura 25: Gráfico do escore de astrócitos reativos entre os grupos estudados. 0: ausência de astrócitos reativos; 1: astrócitos reativos com prolongamentos finos e delicados e 2: astrócitos reativos com prolongamentos grossos. Não houve alteração significativa entre os grupos estudados.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A hidrocefalia causa alterações anatômicas culminando num aumento significativo do volume ventricular devido ao acúmulo de líquido cefalorraquidiano. Este aumento ocasiona distorção das estruturas adjacentes, diminuindo o manto cortical e comprimindo a substância branca. Portanto os danos ocasionados pela hidrocefalia são efeitos diretos da compressão estrutural e indiretos causados pela compressão, distorção das estruturas adjacentes, como por exemplo compressão das veias cerebrais, ocasionando assim, alterações metabólicas celulares que determinam a lesão do parênquima cerebral.

A partir do segundo dia, os animais que receberam a injeção do caulim, já apresentavam os principais sinais clínicos associados à hidrocefalia como: letargia, curvatura acentuada da coluna vertebral, dedos em garra, abaulamento dos ossos do crânio, olhos direcionados para baixo e marcha com base alargada, macrocrania, rarefação dos pelos principalmente da região craniana, dificuldade de ganho de peso. No estudo realizado por (LOPES *et al.*, 2003), a partir do segundo dia após a indução de hidrocefalia com caulim, já eram visíveis os mesmos sinais observados neste trabalho. Essas alterações clínicas observadas nos animais são semelhantes as observadas em humanos. Em pacientes, a hidrocefalia manifesta-se de acordo com a idade, causa e velocidade de evolução. Em recém-nascidos encontramos o aumento do perímetro cefálico e o afastamento das suturas que formam a fontanela anterior, tornando seu fechamento tardio, além de outros sinais clínicos, como o “olhar do sol poente”, também conhecido como sinal de *Parinaud*, decorrente da compressão do recesso pineal (PRATES e ZANON-COLLANGE., 2005), abaulamento da fontanela anterior, ingurgitamento das veias cranianas e dificuldade alimentar. Outro sinal clínico frequente é o edema papilar, muito utilizado quando se tem dúvida se os sintomas apresentados são decorrentes de hipertensão intracraniana, a sua presença, dependendo do contexto, praticamente confirma o diagnóstico de hipertensão intracraniana.

Os animais que não receberam tratamento com derivação ventrículo subcutânea, eram menos atentos, mais lentos, demonstravam menor interação social, certo descuido com a higiene, frequente auto isolamento, sinais de agressividade, perda da capacidade de autocuidado, desinteresse pelo ambiente e comportamento inadequado frente ao perigo. Enquanto os animais que foram derivados eram mais ativos e atentos, exploravam mais o ambiente e exibiam com maior frequência comportamentos naturais como as brincadeiras e a autolimpeza corporal.

Outros autores também relataram alterações comportamentais, como agressividade em animais hidrocefálicos (SHAOLIN *et al.*, 2015). O uso da quercetina não alterou significativamente o resultado dos testes comportamentais e foi observado neste estudo que, em comparação aos animais que receberam o placebo, água destilada ou não receberam a medicação, apresentaram melhor desempenho e melhor comportamento, demonstrando que o uso da medicação não altera significativamente o curso dos sintomas e não resulta em alterações macroscópicas na hidrocefalia, mas pode ajudar a prevenir uma rápida evolução dos sintomas.

Os animais dos grupos submetidos a DVSC (HD, HDA, HDQp e HDQg) apresentaram menor ganho de peso global que os animais dos demais grupos, sem alteração significativa, fato explicado pela agressão cotidiana e pelo procedimento cirúrgico, que enfraqueceu os animais a ponto de dificultar a amamentação, ganho de peso, além do corpo precisar de tempo para gerenciar o estresse causado pela reação metabólica inflamatória do trauma cirúrgico. O estudo de Lopes, Machado e Lachat (2003) mostrou resultados semelhantes: não foram observadas diferenças significativas entre os animais hidrocefálicos e controles, no entanto, o grupo hidrocefálico ganhou menos peso. No estudo de Del Bigio, Wilson e Enno (2003), os animais hidrocefálicos levaram mais tempo para ganhar peso e foram estatisticamente diferentes do grupo controle, que gradualmente ganhou peso ao longo do experimento. No teste de *open field*, observamos que os animais hidrocefálicos não tratados apresentaram redução da atividade exploratória, marcha com padrão anormal e/ou instável e movimentos atáxicos. Esses sinais também foram relatados por outros autores em vários estudos com animais hidrocefálicos, como ratos (DEL BIGIO *et al.*, 2003), camundongos (LOPES *et al.*, 2009). O padrão comportamental dos animais não melhorou significativamente após o tratamento da hidrocefalia, seja através de DVSC, quercetina ou combinados. Consideramos que o período de avaliação é muito curto para se obter um resultado comportamental efetivo, até porque os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico no meio do estudo.

No teste do labirinto aquático *Morris (water maze)*, descobrimos que o pior desempenho foi atribuído aos animais submetidos a DVSC, pois levaram mais tempo para chegar à plataforma. Ao mesmo tempo, foi observado em animais submetidos a DVSG que todos melhoraram seus tempos de um teste realizado no período da manhã para a tarde nos testes realizados no P10. No P14 os animais que receberam a quercetina apresentaram uma melhora no desempenho no período vespertino, sendo que o grupo HQp apresentou um desempenho vespertino próximo ao do grupo controle. Os animais que receberam o tratamento combinado apresentaram melhora no teste P14 vespertino, porém não foi evidente comparado ao grupo que recebeu apenas a quercetina, mais uma vez discute-se o mecanismo fisiológico de

adaptação dos animais ao procedimento cirúrgico, pois esperava-se que os animais submetidos ao tratamento combinado tivessem um desempenho superior ao dos animais com quercetina isolada. O procedimento cirúrgico para instalação de DVSC apesar de tratar a fisiopatologia da hipertensão intracraniana, nesta faixa etária é extremamente agressivo, e demanda tempo para que o organismo dos animais se recupere e ao mesmo tempo recuperem os danos causados pela hidrocefalia. Em crianças abaixo de 1500g, por exemplo, o procedimento para instalação de DVP é contraindicado pela maioria dos neurocirurgiões devido as complicações ocasionadas, neste período, portanto, as alterações da hidrocefalia são menos deletérias que o procedimento cirúrgico para seu tratamento (PULIDO-RIVAS *et al.*, 2007). O mesmo acontece nos nossos animais, o fato de operá-los com 14 dias de vida torna o procedimento cirúrgico muito agressivo e a sua recuperação mais lenta, acreditamos que a observação por apenas 14 dias após o procedimento não seja suficiente para obter a resposta adequada esperada.

A partir da coloração histológica por hematoxilina e eosina, observamos que a quercetina não foi capaz de evitar a expansão ventricular, porém os animais submetidos a DVSC apresentaram uma recuperação anatômica significativa. Havia sinais de rotura e desnudamento entre as fibras do CC, presença de rasgos na MG e no córtex, redução da população celular da MG, espessura bastante comprimida do córtex e, obviamente, ventrículos laterais amplamente alargados. Entretanto a terapêutica medicamentosa utilizada não impede a expansão ventricular e tampouco os danos na citoarquitetura, mas poderá evitar, desacelerar ou reparar os danos celulares. Em contrapartida os animais que receberam a DVSC apresentaram alterações histológicas leves ou mesmo semelhantes ao grupo controle com matriz germinativa íntegra e córtex pouco lesionado.

A análise histológica por solocromo-cianina, nos animais hidrocefálicos, exibiu tonalidade de azul mais fraca do que os animais controles, indicando que a hidrocefalia reduz a quantidade de mielina presente no tecido cerebral. O comprometimento da mielinização em roedores hidrocefálicos também foi observado por outros pesquisadores utilizando a mesma metodologia (LOPES *et al.*, 2009), mas também foi visto em ratos hidrocefálicos adultos (CARDOSO *et al.*, 2011). Infelizmente através da metodologia utilizada para gerar hidrocefalia, não controlamos o grau e a evolução da mesma, por este fato durante a avaliação da análise histológica de solocromo cianina, os animais do grupo HN apresentaram uma espessura de corpo caloso menor que o grupo HA, ambos são animais não tratados, a única diferença é que o grupo HA foi submetido ao estresse diário através de aplicação peritoneal de água destilada, o veículo utilizado para a diluição da quercetina. O grupo controle apresentou significativamente uma espessura do CC menor que o grupo que utilizou apenas água destilada.

Os animais dos grupos que receberam o tratamento combinado, quercetina e DVSC, apresentaram significativamente menor espessura do CC em comparação com o grupo dos animais que receberam apenas a água destilada peritoneal. Remetendo-se a pensar que a hidrocefalia mais o estresse diário ocasionado pela administração da medicação são deletérios ao organismo e o tratamento combinado foi capaz de reverter os efeitos ocasionados por ambos. Quando colocados todos os animais dos grupos derivados (HD, HDA, HDQp, HDQg) comparados com todos os animais dos grupos não derivados (HN, HA, HQp, HQg) com exceção do grupo controle, observa-se que houve uma diferença significativa na espessura do corpo caloso dos animais não derivados comparados com o grupo controle, mostrando que a derivação ocasiona uma diminuição do volume ventricular e consequentemente descompressão do corpo caloso, porém esta melhora não é significativa o suficiente para se retornar a anatomia ventricular previa.

Na análise da espessura do CC, os animais hidrocefálicos tinham menor espessura média do que os animais controles, devido a compressão/estiramento sofridos em decorrência da dilatação ventricular. Quando analisados os grupos de animais derivados e não derivados podemos evidenciar diferença significativa na comparação entre o grupo controle e não derivado. Em contrapartida não houve diferença significativa na comparação entre os grupos derivados e não derivados, discutimos mais uma vez o tempo necessário para que tenhamos uma resposta anatômica do organismo animal após a realização da derivação, e se realmente nesta faixa etária os benefícios do procedimento superam os riscos uma vez que o cérebro ainda está em desenvolvimento e ainda não ocorreu completamente o fechamento da calota craniana.

O melhor momento para realizar o tratamento da hidrocefalia em crianças pré-maturas ainda é muito discutido, o ideal é realizar o tratamento quando os sintomas de hipertensão intracraniana são evidentes, pois realizar o tratamento sem evidencia clínica/radiológica de hipertensão intracraniana pode significar adicionar todos os riscos inerentes do procedimento cirúrgico, anestésico em crianças de alto risco.

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 e liberação de diversos neurotransmissores, participação na formação da barreira hematoencefálica e no funcionamento das sinapses (GOMES *et al.*, 2013). Uma das características mais notáveis dos astrócitos é a sua resposta vigorosa a diversos insultos neurológicos. A astrogliose reativa é caracterizada pela alta proliferação dos astrócitos e por extensa hipertrofia do corpo celular e dos processos citoplasmáticos, tanto no local da lesão quanto em áreas vizinhas. Na análise imunoistoquímica do GFAP, observamos que os animais

HN apresentaram intensa reação astrocitária, com astrócitos grosseiros, intensamente ramificados, com corpos celulares hiperplásicos e hipertróficos, que sintetizam numerosas quantidades da proteína específica dos astrócitos, o GFAP. Tais características indicam lesões no tecido nervoso, observadas em várias modalidades de agressão ao SNC, como em infecções virais, doenças desmielinizantes, inflamações, lesões cerebrais agudas traumáticas e em doenças neurodegenerativas (MUCKE *et al.*, 1991). Na análise imuno-histoquímica do GFAP do corpo caloso, este estudo evidenciou que houve alteração significativa entre os grupos HDQp x C e HN x C, mostrando que os animais não tratados, HN, apresentam mais astrócitos reativos que o grupo controle, ou seja a hidrocefalia causa significativamente lesão glial, fato este que já foi demonstrado em outros trabalhos do laboratório (ROCHA CATALÃO *et al.*, 2014). Enquanto o grupo HDQp apresentou maior lesão glial quando comparados aos grupos controle e HQg, provavelmente neste caso o próprio cateter de derivação ventricular utilizado causou lesão glial, talvez pelo posicionamento subótimo comparados com o dos outros grupos derivados. Na análise do GFAP do córtex e matriz germinativa não encontramos alterações significativas entre os grupos, o que mostra, que a lesão glial nos períodos iniciais é predominantemente localizada nos ventrículos e tecidos adjacentes. Os astrócitos reativos desempenham importante papel na fase de reparação do SNC, monitorando ativamente e controlando os conteúdos moleculares e iônicos do espaço extracelular (ENG e 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 pode ser atribuído aos resultados negativos do grupo HN.

Na análise imunoistoquímica do Ki-67, vimos que o número de células presentes na matriz germinativa nos grupos HN, HD e HDA encontraram-se reduzidos, porém, as células remanescentes estão em intensa replicação celular, sugerimos que, na tentativa de suprir os danos causados pela hidrocefalia, o organismo busca compensar a redução celular com a maior produção de novas células, talvez, por este motivo, não observamos diferenças significativas entres os grupos. Por outro lado, os grupos que apresentaram maior marcação de Ki67 foram os grupos que receberam o tratamento combinado, quercetina e derivação, mostrando que a utilização de ambos pode ser efetiva para acelerar o processo de reparação do ciclo celular, uma vez que o grupo que recebeu apenas o tratamento com a derivação a densidade celular marcada por Ki67 na matriz germinativa foi próxima do grupo HN. Porém, através da análise do Ki67 não encontramos embasamento significativo para justificar o efeito neuroprotetor da quercetina.

Marcadores de morte celular programada, tais como a cisteína protease 32, conhecida como caspase-3, responsável pela clivagem proteolítica de várias proteínas, é um indicador de

apoptose, ou morte celular programada. Na avaliação imuno-histoquímica por caspase-3 não encontramos alterações significativas entre os grupos quando estudado a caspase-3 no CC, porém houve alteração significativa no estudo da caspase-3 do córtex cerebral entre os grupos HNxC, HNxHDA, HNxHDQp, HNxHQg e HNxHDQg, ou seja, os animais dos grupos que não receberam o tratamento apresentaram significativamente maior densidade de células marcadas por caspase-3 que os animais que receberam alguma forma de tratamento, sendo melhor quando comparados com os grupos que receberam o tratamento combinado. Ou seja, animais que não receberam o tratamento, seja a DVSC ou quercetina apresentaram maior perda do controle da apoptose que animais que receberam o tratamento, mostrando que a hidrocefalia prejudica o controle celular da apoptose e o tratamento, seja DVSC, quercetina ou combinado pode evitar ou desacelerar o descontrole celular da apoptose. Houve diferença significativa na análise da caspase-3 celular entre os grupos HN e HDA, mostrando que a hidrocefalia mais o estresse diário da aplicação da medicação causaram significativamente um descontrole da apoptose.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Após a administração de quercetina nos animais hidrocefálicos podemos concluir que:

1. O tratamento não produz efeitos benéficos clínicos nos testes comportamentais, assim como no peso.
2. A quercetina não altera a taxa de divisão celular na matriz germinativa.
3. A quercetina não altera a taxa de apoptose celular do corpo caloso, porém quando associada a derivação ventricular, melhora a taxa de apoptose celular do córtex cerebral.
4. A quercetina não melhora os danos celulares causados aos astrócitos no corpo caloso e córtex cerebral.
5. A administração da quercetina não modifica o tamanho ventricular.
6. A derivação ventricular diminui o tamanho ventricular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATEMAN, G. A.; BROWN, K. M. The measurement of CSF flow through the aqueduct in normal and hydrocephalic children: from where does it come, to where does it go? **Childs Nerv Syst**, v. 28, n. 1, p. 55-63, Jan 2012. ISSN 1433-0350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22038153> >.

BATEMAN, G. A.; SIDDIQUE, S. H. Cerebrospinal fluid absorption block at the vertex in chronic hydrocephalus: obstructed arachnoid granulations or elevated venous pressure? **Fluids Barriers CNS**, v. 11:11, p. 1-10, 2014.

BUTTERFIELD, D. A. Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. **Free Radic Res**, v. 36, n. 12, p. 1307-13, Dec 2002. ISSN 1071-5762. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12607822> >.

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. ISSN 1678-2674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22030808> >.

DAVSON, H.; SEGAL, M. B. **Physiology of the CSF and Blood–Brain Barriers**. CRC Press: 1996. 832.

DEL BIGIO, M. R. Neuropathology and structural changes in hydrocephalus. **Dev Disabil Res Rev**, v. 16, n. 1, p. 16-22, 2010. ISSN 1940-5529. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20419767> >.

DEL BIGIO, M. R.; CROOK, C. R.; BUIST, R. Magnetic resonance imaging and behavioral analysis of immature rats with kaolin-induced hydrocephalus: pre- and postshunting observations. **Exp Neurol**, v. 148, n. 1, p. 256-64, Nov 1997. ISSN 0014-4886. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398467> >.

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, n. 3, p. 337-46, Mar 2003. ISSN 0364-5134. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12601701> >.

DESCHNER, E. E. et al. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 7, p. 1193-6, Jul 1991. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2070483> >.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S. GFAP and astrogliosis. **Brain Pathol**, v. 4, n. 3, p. 229-37, Jul 1994. ISSN 1015-6305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7952264> >.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cell Signal**, v. 19, n. 9, p. 1807-19, Sep 2007. ISSN 0898-6568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570640> >.

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. 61-84, 2013. ISSN 0103-4014.

GUPTA, R.; SINGH, M.; SHARMA, A. Neuroprotective effect of antioxidants on ischaemia and reperfusion-induced cerebral injury. **Pharmacol Res**, v. 48, n. 2, p. 209-15, Aug 2003. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798674> >.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem**, v. 59, n. 5, p. 1609-23, Nov 1992. ISSN 0022-3042. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1402908> >.

_____. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001. ISSN 1170-229X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11599635> >.

HEO, H. J.; LEE, C. Y. Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 25, p. 7514-7, Dec 2004. ISSN 0021-8561. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15675797> >.

HLADKY, S. B.; BARRAND, M. A. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. **Fluids Barriers CNS**, v. 11, n. 1, p. 26, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25678956> >.

JUCÁ, C. E. B. et al. Treatment of hydrocephalus by ventriculoperitoneal shunt: analysis of 150 consecutive cases in the Hospital of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 59-63, 2002. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502002000900013&lng=en&nrm=iso >.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbs. **British Journal of Medicine & Medical Research**, v. 7, p. 438-457, 2015. ISSN 2231-0614.

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. ISSN 2234-8999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27169064> >.

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

96, Sep 2009. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19460371> >.

LOPES, L. S.; MACHADO, H. R.; LACHAT, J. J. Study of corpus callosum in experimental hydrocephalic wistar rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p. 10-14, 2003.

MELO, J. R. T.; PASSOS, R. K.; CARVALHO, M. L. C. M. Cerebrospinal fluid drainage options for posthemorrhagic hydrocephalus in premature neonates. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 75, n. 7, p. 433-438, Jul 2017. ISSN 1678-4227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28746429> >.

MOKGOKONG, R. et al. Ion transporters in brain endothelial cells that contribute to formation of brain interstitial fluid. **Pflugers Arch**, v. 466, n. 5, p. 887-901, May 2014. ISSN 1432-2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022703> >.

MUCKE, L. et al. Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. **New Biol**, v. 3, n. 5, p. 465-74, May 1991. ISSN 1043-4674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1883812> >.

NAVARRO-YEPES, J. et al. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. **Pharmacol Ther**, v. 142, n. 2, p. 206-30, May 2014. ISSN 1879-016X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24333264> >.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am J Clin Nutr**, v. 74, n. 4, p. 418-25, Oct 2001. ISSN 0002-9165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566638> >.

PRATES, M. A.; ZANON-COLLANGE, N. **Hidrocefalia**. São Paulo: Manole, 2005.

PULIDO-RIVAS, P. et al. [Treatment of hydrocephalus secondary to intraventricular haemorrhage in preterm infants. A review of the literature]. **Rev Neurol**, v. 44, n. 10, p. 616-24, 2007 May 16-31 2007. ISSN 0210-0010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17523121> >.

RAJENDRAN, P. et al. Antioxidants and human diseases. **Clin Chim Acta**, v. 436, p. 332-47, Sep 2014. ISSN 1873-3492. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24933428> >.

REITER, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **FASEB J**, v. 9, n. 7, p. 526-33, Apr 1995. ISSN 0892-6638. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7737461> >.

ROCHA CATALÃO, C. H. et al. Pre- and postshunting magnetization transfer ratios are in accordance with neurological and behavioral changes in hydrocephalic immature rats. **Dev**

Neurosci, v. 36, n. 6, p. 520-31, 2014. ISSN 1421-9859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25342396> >.

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. ISSN 1433-0350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26906479> >.

SATO, H. et al. Differential cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion. **Neuroscience**, v. 248, p. 345-58, Sep 2013. ISSN 1873-7544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774632> >.

SHAOLIN, Z. et al. Hydrocephalus induced via intraventricular kaolin injection in adult rats. **Folia Neuropathol**, v. 53, n. 1, p. 60-8, 2015. ISSN 1509-572X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25909876> >.

SPECTOR, R.; JOHANSON, C. E. Sustained choroid plexus function in human elderly and Alzheimer's disease patients. **Fluids Barriers CNS**, v. 10, n. 1, p. 28, Sep 2013. ISSN 2045-8118. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24059870> >.

SPECTOR, R. et al. A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. **Exp Neurol**, v. 267, p. 78-86, May 2015. ISSN 1090-2430. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747036> >.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075-81, Dec 2003. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581295> >.

TISELL, M. How should primary aqueductal stenosis in adults be treated? A review. **Acta Neurol Scand**, v. 111, n. 3, p. 145-53, Mar 2005. ISSN 0001-6314. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15691282> >.

WARF, B. C.; TRACY, S.; MUGAMBA, J. Long-term outcome for endoscopic third ventriculostomy alone or in combination with choroid plexus cauterization for congenital aqueductal stenosis in African infants. **J Neurosurg Pediatr**, v. 10, n. 2, p. 108-11, Aug 2012. ISSN 1933-0715. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747094> >.

WU, J. Q.; KOSTEN, T. R.; ZHANG, X. Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. 2013.