UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Efeitos de um derivado polifenólico da *Camellia sinensis* na hidrocefalia experimental induzida em ratos Wistar

Carlos Henrique Rocha Catalão

RIBEIRÃO PRETO

2013

CARLOS HENRIQUE ROCHA CATALÃO

Efeitos de um derivado polifenólico da *Camellia sinensis* na hidrocefalia experimental induzida em ratos Wistar

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas

Área de concentração: Morfologia e Medicina Experimental

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luiza da Silva Lopes

RIBEIRÃO PRETO

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Catalão, Carlos Henrique Rocha

Efeitos de um derivado polifenólico da *Camellia sinensis* na hidrocefalia experimental induzida em ratos Wistar. Ribeirão Preto, 2013.

78 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Morfologia e Medicina Experimental

Orientador: Lopes, Luiza da Silva.

1. Hidrocefalia experimental. 2. Neuroproteção. 3. Chá verde. 4. Polifenol. 5. Imunoistoquímica.

CATALÃO, C. H. R. **Efeitos de um derivado polifenólico da *Camellia sinensis* na hidrocefalia experimental induzida em ratos Wistar.** 2013. 78 f. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas – opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes (Orientadora)

Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan

Instituição: FMRP-USP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dra. Márcia Rita Fernandes Machado

Instituição: FCAV-UNESP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Ribeirão Preto
2013

À Salvador e Amélia,
meus avós amados

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Senhor Jesus, o único e verdadeiro Deus, o autor e consumidor da minha fé. Àquele que deu sentido a minha vida...

Aos meus pais, Vanderlei e Neusa, pelo ensino dos princípios humanos, pela formação do meu caráter e pela condução através do caminho da Vida. Obrigado pelo sacrifício, pela entrega e pela cumplicidade em todas as etapas deste trabalho. Vocês são meus modelos e o exemplo mais palpável da expressão do amor Deus. Amo muito vocês!

À minha querida irmã Patrícia pelas palavras de encorajamento em momentos fundamentais. Pelo exemplo de coragem e perseverança frente às adversidades da vida.

À minha amada noiva Sulamita, pelo companheirismo e pela cumplicidade em todos os momentos. Sua presença, suas palavras, seu carinho e suas orações, fizeram toda a diferença nessa longa trajetória. Obrigado pelo amor incondicional dedicado a mim; você é o motivo da minha perseverança! Amo muito você!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Luiza, pela oportunidade concedida através da abertura das portas do seu laboratório e pela confiança de que a execução deste trabalho seria possível. Agradeço por sua atenção, paciência e disponibilidade no ensino da ciência e pesquisa. Além disso, pelos princípios éticos e morais aprendidos nesses anos de convivência.

Ao pesquisador Samuel Takashi Saito do Centro de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC-BA), pela produção do extrato do chá verde utilizado neste trabalho.

Aos professores da Faculdade de Farmácia, Norberto Lopes e João Carlos de Mello, pela colaboração no ensino a respeito do chá verde e extração de suas catequinas.

Aos amigos Marquinhos e Diego, pelo companheirismo demonstrado através do trabalho e das palavras sempre positivas de encorajamento. Pelo ótimo ambiente de trabalho fruto da alegria e bom humor de vocês. Aquele abraço!

Aos amigos e irmãos Fabinho, Tagid, Jonathan e Carlinhos, pelo companheirismo expresso através da cumplicidade, das orações e da comunhão. Pelo humor e alegria contagiante de vocês. Grande abraço a todos!

A todo o pessoal do laboratório, Ana Leda, Camila, Jaqueline, Pedro, Lara e Gláucia.

Aos técnicos do laboratório Izilda, Sandra e Renato, pela assistência prática e teórica durante o desenvolvimento deste trabalho, assim como pela amizade.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Tudo isso é muito complexo, e ao mesmo tempo maravilhoso demais, para que seja mero fruto do acaso, da evolução ou de uma simples explosão.”

“Graças te dou, visto que por modo assombrosamente maravilhoso me formaste; as tuas obras são admiráveis, e a minha alma o sabe muito bem;”

“Os teus olhos me viram a substância ainda informe, e no teu livro foram escritos todos os meus dias, cada um deles escrito e determinado, quando nenhum deles havia ainda.”

Sl 139:14,16

RESUMO

CATALÃO, C. H. R. **Efeitos de um derivado polifenólico da *Camellia sinensis* na hidrocefalia experimental induzida em ratos Wistar.** 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A hidrocefalia é uma síndrome complexa caracterizada pelo acúmulo de líquido cérebro-espinhal no interior das cavidades ventriculares. Considerando a sua fisiopatologia de caráter multifatorial sendo um dos fatores envolvidos o estresse oxidativo desencadeado pela peroxidação lipídica e formação de radicais livres, este trabalho visa estudar o possível efeito neuroprotetor proveniente do polifenol galato de epigallocatequina (EGCG) na hidrocefalia experimental. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (N=56), com 7 dias de idade. Os filhotes foram submetidos à indução da hidrocefalia pelo método da injeção intracisterna de caulim a 20%. O polifenol foi administrado intraperitonealmente por 9 ou 20 dias consecutivos a partir da indução da hidrocefalia. Aferição do peso corporal diário e testes comportamentais foram realizados. Dez ou 21 dias após a indução da hidrocefalia os animais, profundamente anestesiados, foram sacrificados através da perfusão cardíaca com solução salina. Seus encéfalos foram removidos, fixados com paraformaldeído 3% em tampão fosfato 0,1M e processados para inclusão em parafina. Preparações histológicas foram realizadas para a análise por coloração hematoxilina eosina, solocromo-cianina e imunoistoquímica para GFAP e Ki67. Os diferentes parâmetros de avaliação demonstraram que os animais tratados com o polifenol por 9 dias consecutivos apresentaram redução da atividade astrocitária através da imunomarcagem pelo GFAP no corpo caloso, cápsula externa e matriz germinativa; além de apresentarem corpo caloso mais espesso e mielinizado, exibindo uma tonalidade azul mais intensa evidenciada pela coloração solocromo-cianina. Apesar desses resultados demonstrarem um possível efeito neuroprotetor na fase inicial de instalação da doença, estudos adicionais devem ser realizados para obtenção de uma terapêutica eficiente e segura para o aprofundamento com testes clínicos.

Palavra-chave: Hidrocefalia experimental. Neuroproteção. Chá verde. Polifenol. Imunoistoquímica.

ABSTRACT

CATALÃO, C. H. R. **The effects of a *Camellia sinensis*-derived polyphenolic in induced experimental hydrocephalus in Wistar rats.** 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Hydrocephalus is a complex syndrome, characterized by the accumulation of cerebrospinal fluid in cerebral ventricles. Considering its multifactorial pathophysiology, one of the factors being the oxidative stress triggered by lipid peroxidation and free radical formation, this work aims to study the possible neuroprotective effect of the polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG) in experimental hydrocephalus. Seven-day old Wistar rats (N=56) were used in this study. The pups were subjected to hydrocephalus induction by kaolin 20% through intracisternal injection. The polyphenol was administered intraperitoneally for 9 or 20 days from the induction of hydrocephalus. Measurement of daily body weight and behavioral tests were performed. The animals, deeply anesthetized, were sacrificed by cardiac perfusion with saline 10 or 21 days after induction of hydrocephalus. Their brains were removed, fixed with 3% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, and processed for paraffin embedding. Preparations were made for histological analysis by hematoxylin and eosin, solochrome-cyanine and immunohistochemistry for GFAP and Ki67. The different evaluated parameters showed that animals treated with the polyphenol for 9 consecutive days displayed reduction on the reactive astrocytes GFAP immunostaining at the corpus callosum, external capsule and germinal matrix, also having thicker and more myelinated corpus callosum exhibiting a more intense blue staining by solochrome-cyanine. Although these results demonstrate a possible neuroprotective effect at the initial onset of the disease, additional studies should be performed to obtain an effective and safe therapy for deeper studies in clinical trials.

Keywords: Experimental hydrocephalus. Neuroprotection. Green tea. Polyphenol. Immunohistochemistry.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1 Hidrocefalia	14
2 Hidrocefalia experimental.....	17
3 Estresse oxidativo e formação de espécies reativas de oxigênio	18
4 <i>Camellia sinensis</i> (chá verde) e seus componentes	22
5 Neuroproteção e Catequinas	23
JUSTIFICATIVA.....	27
OBJETIVO	29
MATERIAIS E MÉTODOS	31
1 Animais	31
2 Grupos experimentais	31
3 Indução da hidrocefalia	32
4 Administração do derivado polifenólico	32
5 Estudos comportamentais.....	33
6 Coleta das amostras	35
7 Estudos histopatológicos	36
8 Documentação fotográfica e análise morfométrica	38
9 Análise estatística	38
RESULTADOS.....	40
1 Observação clínica e comportamental.....	40
2 Avaliação do peso corporal.....	41

3 Avaliação comportamental.....	42
4 Análise histopatológica	44
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS.....	73

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1 Hidrocefalia

A hidrocefalia não pode ser considerada uma simples entidade clínica, e sim uma doença com complexa fisiopatologia que compreende não só a dinâmica do líquido cérebro-espinhal, como também outras estruturas do sistema nervoso central. Está associada à dilatação ventricular e, frequentemente, ao aumento da pressão intracraniana. Pode acometer qualquer faixa etária, mas envolve etiologia e manifestações clínicas peculiares a cada uma. É descrita como um grande problema de cunho social e, para os neurocirurgiões, apresenta-se ainda como um enigma em sua abordagem e manipulação do tratamento.

Informações epidemiológicas do Serviço Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (EUA) registraram mais de 125 mil derivações liquóricas realizadas no ano de 1995. De todos estes procedimentos 33 mil resultaram na colocação de válvula para o tratamento da hidrocefalia (BONDURANT; JIMENEZ, 1995). Segundo Cochrane et al. (1995), o país tem um gasto estimado de 100 milhões de dólares anuais, somente com exames para diagnóstico e direção de adequada conduta terapêutica, enquanto o gasto envolvido no tratamento da hidrocefalia varia segundo o sistema de derivação escolhido, uso de medicamentos, especialmente os antibióticos, além das cirurgias e do tempo de hospitalização para esses procedimentos.

No ano de 2003 houve aproximadamente 38 mil visitas a serviços de emergência em busca de atendimento decorrente do comprometimento no sistema de derivação liquórica (obstrução e/ou infecção) de crianças hidrocefálicas. No mesmo ano, os gastos gerados em unidade de terapia intensiva pediátrica chegaram a quase 2 bilhões de dólares no país (EUA), e a hidrocefalia foi responsável por 3,1% dessas despesas (SIMON et al., 2008).

Quanto aos custos do tratamento e procedimentos pertinentes à hidrocefalia no Brasil, não foram encontradas na literatura e na página eletrônica do Ministério da Saúde informações condizentes. Os estudos realizados no país abordam somente sua etiologia, diagnóstico, complicações, sequelas e fatores associados. Dados mais específicos estão comumente atrelados à prática diária de neurologistas e

neurocirurgias, e igualmente disponíveis em Organizações Não Governamentais (ONGs).

Várias classificações tentam definir a hidrocefalia de acordo com critérios diversos, não sendo nenhuma classificação, portanto, completa e satisfatória. Quanto aos processos patológicos, pode ser de desenvolvimento agudo ou crônico. Além disso, pode ainda ser classificada de acordo com o ponto de bloqueio da circulação líquórica em não comunicante, quando o bloqueio encontra-se dentro do sistema ventricular, e comunicante, quando fora do sistema, afetando as cisternas da base do encéfalo ou outros pontos do espaço subaracnóideo, ou ainda as vilosidades aracnóideas. Hidrocefalia pode ser causada por obstrução das vias do líquido cérebro-espinhal ou por super produção do mesmo. Estas duas causas básicas podem ser desencadeadas por neoplasias, malformações congênitas ou processos inflamatórios (MILHORAT, 1979). A causa da hidrocefalia congênita não é bem elucidada; segundo Jansen (1988), ela está frequentemente associada a outras síndromes ou malformações.

A produção líquórica normal em um homem adulto é de cerca de 500 ml por dia. Como os espaços líquóricos comportam entre 130 e 140 ml, existe troca total do líquido cérebro-espinhal por 3 ou 4 vezes ao dia (MCLONE, 1994). Na hidrocefalia, com a dinâmica líquórica alterada e o acúmulo de líquido cérebro-espinhal no sistema ventricular dilatado, ocorre uma estagnação e deficiência na eliminação de metabólitos (CASTRO-GAGO et al., 1989). Com o acúmulo do líquido cérebro-espinhal nas cavidades ventriculares, a pressão intracraniana se eleva principalmente nos estágios agudos da hidrocefalia obstrutiva. Todavia, o incremento na pressão intracraniana não é o único fator implicado na gênese da dilatação ventricular da hidrocefalia. Isto pode ser constatado na hidrocefalia de pressão normal, na qual a pressão intracraniana, aparentemente compensada e retornando a valores normais durante o desenvolvimento do processo, não impede que a dilatação ventricular progrida. Provavelmente, o que na verdade leva à dilatação dos ventrículos cerebrais é o gradiente de pressão entre estes e o parênquima cerebral (SATO et al., 1999). O aumento dos ventrículos leva à distorção do cérebro, por comprimir os hemisférios cerebrais contra a superfície interna do crânio. Caso as suturas cranianas ainda estejam patentes, o crânio inteiro aumenta em resposta à expansão

dos ventrículos cerebrais, aumentando o trauma encefálico, por adicionar forças de estiramento à força de compressão.

A primeira estrutura a sofrer com o aumento da pressão liquórica e a dilatação ventricular é o epêndima, epitélio que reveste a superfície dos ventrículos cerebrais e do canal central da medula; em casos mais graves o epitélio pode ser completamente rompido. As alterações do plexo coróide são mais brandas que do epêndima, com distorções das vilosidades, achatamento e vacuolização das células, com formação de inclusões intracelulares e alargamento dos espaços intercelulares (DEL BIGIO et al., 1985; KIEFER et al., 1998; DEL BIGIO et al., 2002; TIRAPELLI et al., 2007).

A substância branca também sofre as consequências da dilatação ventricular com diferenças regionais, sendo dependente da idade de instalação da hidrocefalia. Em crianças pequenas, o corno occipital dilata antes das outras divisões dos ventrículos devido à imaturidade do parênquima cerebral dos lobos occipitais. Em indivíduos mais velhos, ao contrário, as regiões anteriores dos ventrículos laterais são as primeiras a dilatarem, comprimindo a substância branca dos lobos frontais (DEL BIGIO et al., 1985; KIEFER et al., 1998). Em estudo com camundongos com idades de instalação da hidrocefalia diferentes, foi observado ventriculomegalia grave com consequente destruição da substância branca no grupo de animais injetados no sétimo dia de idade (camundongos jovens). Em contrapartida, no grupo injetado com 7 – 8 semanas de idade (adultos jovens), foi observada dilatação ventricular moderada, sem, entretanto, evidente destruição da substância branca, apesar do afilamento do corpo caloso (LOPES et al., 2009).

Além de todos esses danos ao tecido cerebral, as forças de estiramento e compressão desencadeadas pela dilatação ventricular, provocam, segundo Mabe, Suzuki e Nagai (1990), degeneração axonal, em especial na hidrocefalia crônica, bem como perda da mielina nos graus mais acentuados de dilatação ventricular. O dano da mielina pode ainda ser resultado do edema, pois o líquido cérebro-espinhal contém enzimas proteolíticas. Mais tardiamente, ocorre astrogliose, em substituição aos axônios e mielina lesados. Nos graus extremos de dilatação ventricular, o corpo caloso pode ser completamente destruído. Em animais de experimentação, a destruição pode chegar até a superfície pial, formando uma comunicação da

cavidade ventricular com o espaço subaracnóideo, em uma ventriculostomia espontânea (DEL BIGIO; MCALLISTER II, 1999).

A distorção do encéfalo leva a um estiramento e distorção dos vasos cerebrais além da redução da densidade dos capilares, ocorrendo queda do fluxo sanguíneo cerebral (ANDEWEG, 1989; PORTNOY et al., 1994). A hidrocefalia também atinge o neurônio e compromete as sinapses. O corpo neuronal pode apresentar cromatólise e vacuolização e os dendritos podem estar encurtados e reduzidos em número com menor quantidade de espículas dendríticas. A compressão cortical causa um empacotamento dos neurônios, com redução no tamanho e arredondamento ou achatamento dos neurônios piramidais (EDWARDS et al., 1984; KHAN, et al., 2006). Já o hipocampo apresenta alterações discretas, e os núcleos da base e o tálamo também tem seus neurônios mais preservados, o mesmo ocorrendo com o cerebelo.

A conectividade neuronal também está prejudicada, fato demonstrado pela avaliação do potencial evocado somatosensorial com alterações de sua latência, que aparece somente na hidrocefalia acentuada (JONES, et al., 2000). O metabolismo neuronal está mais comprometido quanto maior é o tamanho dos ventrículos cerebrais. Os neurotransmissores estão com suas concentrações reduzidas, mas os produtos de degradação de seu metabolismo estão aumentados, o que compromete o mecanismo de *clearance* do espaço extracelular (SHOESMITH et al., 2000).

2 Hidrocefalia experimental

Dixon e Heller (1932 apud HOCHWALD, 1985) publicaram o primeiro trabalho utilizando o caulim para produzir hidrocefalia experimental. O caulim causa um processo inflamatório nas meninges, obstruindo a saída do quarto ventrículo, sem lesar diretamente o parênquima cerebral e sem causar inflamação do espaço subaracnóideo da convexidade do crânio (DEFEO et al., 1979; EDWARDS et al., 1984; HOCHWALD, 1985).

Injeção de caulim na cisterna magna tem sido demonstrada como indutor de hidrocefalia não-comunicante que, no estágio agudo, é caracterizada por aumento da pressão intracraniana e progressiva ventriculomegalia. No estágio crônico, a

pressão intracraniana normaliza-se e a dilatação ventricular estabiliza-se (BRAUN et al., 1998). A produção da hidrocefalia por meio da injeção intracisternal de caulim tem sido realizada com sucesso em animais de experimentação como cães, gatos, ratos, e camundongos. Lopes et al. (2009) realizaram com êxito a indução de hidrocefalia através da injeção percutânea de caulim na cisterna magna em camundongos, tanto em adultos jovens, quanto em animais de sete dias de vida. Os autores estudaram os efeitos da doença avaliando as mudanças comportamentais e histológicas nesses animais.

Outros métodos de produção de hidrocefalia experimental apresentam desvantagens em relação ao caulim, pois exigem procedimentos cirúrgicos extensos podendo ocasionar modificações anatômicas indesejáveis. Muitas vezes obtêm-se falhas nos resultados, seja por ocasionar hidrocefalia fulminante, seja pelo índice de produção de hidrocefalia ser muito baixo. Além disso, estes métodos não mimetizam o processo patológico natural da maioria dos casos de hidrocefalia, ao contrário do caulim, que produz reação inflamatória semelhante àquela observada em humanos com hidrocefalia pós-infecção ou hemorragia subaracnóidea (DEFEO et al., 1979; EDWARDS et al., 1984; HOCHWALD, 1985).

Mais recentemente, tem-se utilizado linhagens de animais geneticamente suscetíveis à hidrocefalia (LEE et al., 2012; VOGEL et al., 2012). Entretanto, como os animais apresentam hidrocefalia de instalação ainda no desenvolvimento intra-útero, não se pode escolher qual o momento em que se quer que a dilatação ventricular inicie, somente mimetizando, portanto, a hidrocefalia congênita. Além disso, não se pode garantir que as alterações encontradas sejam puramente consequência da hidrocefalia e não da própria malformação genética.

3 Estresse oxidativo e formação de espécies reativas de oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são moléculas contendo oxigênio (O_2), formadas a partir de radicais livres durante o metabolismo normal e/ou quando o organismo é exposto a vários estímulos, como radiação ionizante ou biotransformação de xenobióticos. Radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos que possuem elétrons desemparelhados em sua última camada (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Em situações fisiológicas, a formação de radicais livres ocorre normalmente no organismo de seres aeróbicos, especialmente durante a respiração. Na mitocôndria, em torno de 1 a 2% do O_2 participa de reações monoeletrônicas, escapando da redução tetravalente do O_2 pela aceitação de quatro elétrons para sua neutralização, resultando na formação de H_2O . Dentre as ERO existem as radicalares, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), e as não-radicalares, derivadas diretamente do oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlet ($O_2^1\Sigma g^+$). O aumento da formação dessas ERO pode levar à condição de estresse oxidativo (SIES, 1997; SHAW, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de ERO e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem os danos por elas causados, os chamados antioxidantes. Segundo Sies (1997), o estresse oxidativo pode resultar da geração excessiva de ERO; da diminuição da capacidade antioxidante natural do organismo ou ainda da combinação desses fatores. As ERO são formadas como um produto normal do metabolismo aeróbico, no entanto, em condições patológicas como, aterosclerose, doença de Parkinson e doença de Alzheimer, podem ser produzidas em taxas elevadas, prejudicando o equilíbrio fisiológico e promovendo danos ao organismo.

Todos os organismos vivos possuem um ambiente intracelular de natureza redutora, existindo um equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida de moléculas. Esse equilíbrio é mantido por enzimas à custa de energia metabólica. Perturbações neste equilíbrio redox podem provocar a produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes celulares, como proteínas, lipídios e o DNA; incluindo danos nas membranas de diversas organelas celulares (mitocôndria, retículo endoplasmático, membrana plasmática).

Em termos químicos, o estresse oxidativo consiste num aumento significativo do potencial de redução celular (tornando-se menos negativo), ou numa diminuição significativa da capacidade redutora de pares redox celulares, como a glutatona (SCHAFFER; BUETTNER, 2001). Os efeitos do estresse oxidativo dependem da dimensão de tais variações. Uma célula é normalmente capaz de superar os efeitos nefastos do estresse oxidativo se as perturbações no equilíbrio redox forem pequenas, restabelecendo o equilíbrio normal intracelular. No entanto, perturbações

de maior escala podem levar à morte celular, apoptose e até necrose (LENNON et al., 1991).

As células possuem como mecanismo de defesa um sistema composto por substâncias antioxidantes agrupadas na categoria de enzimáticas, como a superóxido dismutase, a catalase, e a glutathione peroxidase; e não-enzimáticas como a glutathione, as vitaminas A, C, E e β -caroteno (MARTINDALE; HOLBROOK, 2002). Essas substâncias são responsáveis por retardar, prevenir ou remover danos oxidativos a uma molécula alvo. Halliwell e Gutteridge definem que, um antioxidante é "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, em comparação a um substrato oxidável, atrasa ou inibe significativamente a oxidação desse substrato".

Dentre os compostos não-enzimáticos, a glutathione (GSH), destaca-se como um dos antioxidantes mais importantes nos sistemas vivos; sendo constituído por três aminoácidos: glicina, ácido glutâmico e cisteína. A síntese desse tripeptídeo (γ -glutamylcysteinylglycine), ocorre a partir de uma reação catalisada pela enzima γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), que utiliza o glutamato e a cisteína para dar origem a γ -glutamylcysteine, que juntamente com a glicina, através de uma reação catalisada pela glutathione synthetase, irá formar a glutathione (DRINGEN et al., 2000).

Não menos importante que os compostos de defesa não-proteicos, as enzimas antioxidantes também exercem papel fundamental na proteção contra as ERO. Essa proteção ocorre através da dismutação do $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 catalisada pela superóxido dismutase (SOD), e da remoção de H_2O_2 do meio celular através da catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPx), evitando a formação da espécie altamente reativa como $OH^{\cdot}$ (DRINGEN et al., 2000).

Atualmente existem muitas lacunas a respeito dos mecanismos moleculares responsáveis pela fisiopatologia da hidrocefalia. Na tentativa de desvendar esse enigma, diversos estudos tentaram estabelecer relação entre hidrocefalia e estresse oxidativo. No estudo realizado por Mori et al. (1993), em hidrocefalia congênita no cérebro de ratos adultos WIC-HYD, a análise imunoistoquímica revelou redução na enzima superóxido-desmutase (SOD) no epêndima, plexo coróide, e hipocampo. Em hidrocefalia induzida por caulim em ratos, os níveis de peróxido lipídico podem aumentar após a indução da hidrocefalia (CANER et al., 1993). Segundo Thomas e Cheng (1952), roedores são mais suscetíveis à hidrocefalia se a dieta materna for

pobre em antioxidantes como a vitamina E. Ratos transgênicos com defeitos lipoproteicos carreando vitamina E, frequentemente apresentam anormalidades do tubo neural, incluindo hidrocefalia (HOMANICS et al., 1993; HOMANICS et al., 1995). Além disso, Nuss et al. (1967) descreveram que o metabolismo anormal dos metais, conhecido por participar da cascata oxidativa, está associado com hidrocefalia em animais. Finalmente, bebês com hidrocefalia apresentam níveis elevados de metabólitos no líquido cérebro-espinal, dando indícios de estresse oxidativo (SCHMIDT et al., 1995).

A relação existente entre radicais livres e hidrocefalia ainda é pouco conhecida. O que se sabe é que o estresse oxidativo está presente nesta afecção devido à agressão provocada ao parênquima cerebral, proveniente das forças de compressão e estiramento, ocasionando lesão tecidual. Um exemplo seria a isquemia resultante da injúria exercida sobre os vasos cerebrais. É sabido que as reações de radicais livres, principalmente peroxidação lipídica, têm efeitos tóxicos nas paredes arteriais dos vasos cerebrais, resultando em mudanças similares àquelas observadas no vasoespasma crônico (CANER et al., 1993).

Caner et al. (1993), descreveram ainda a relação da peroxidação lipídica com as alterações da estrutura cerebral em ratos com hidrocefalia. Foi demonstrado que os altos níveis de peroxidação lipídica encontrados no sangue retirado das artérias do polígono arterial da base do encéfalo (polígono de Willis) desses animais estavam associados à vasoespasmos com dobramentos e ondulações da lâmina elástica. Além disso, foi sugerido que as mudanças vasculares observadas devem-se ao elevado nível de peroxidação lipídica desencadeada por uma possível isquemia provocada pela hidrocefalia graças ao estiramento dos vasos cerebrais. Para os autores, o efeito mais importante da peroxidação lipídica sobre as paredes arteriais do cérebro são os dobramentos e as ondulações da lâmina elástica finalmente seguida por degeneração da camada muscular (CANER et al., 1993). Fersten et al. (2004), estudaram o papel dos radicais livres, especificamente os produtos da peroxidação lipídica no líquido de 24 pacientes com hidrocefalia de pressão normal (HPN). Concluíram que essas substâncias modificam a estrutura das membranas biológicas e podem, portanto, estar envolvidas na patogênese da hidrocefalia crônica em adultos.

4 *Camellia sinensis* (chá verde) e seus componentes

O primeiro registro escrito sobre o chá verde foi encontrado há mais de cinco mil anos em um dos livros mais importantes da Medicina Tradicional Chinesa denominado *Nei Jing – O Clássico do Imperador Amarelo* (TREVISANATO; KIM, 2000).

O chá é uma bebida tradicional e seus atributos são usados pelos orientais há milênios. Muitas lendas retratam sua origem. A mais remota data de 2737 a.C. quando imperador da China, Shen Nung, descansava sob a sombra de algumas árvores enquanto seus servos ferviam água para ele beber. Durante a espera, algumas folhas caíram na sua vasilha de água fervente e ele acordou com o suave aroma da infusão. Após provar a bebida e apreciar o seu sabor nascia o chá verde.

No século IX o chá verde era cultivado nos campos do Japão pelos monges budistas que trouxeram sementes da China. Nestes dois países o chá ganhou grande importância econômica, religiosa e cultural. No Japão existe todo um cerimonial repleto de significados e rituais envolvendo o chá. Somente no início do século XVII o chá chegaria a Europa trazida pelos holandeses através das rotas comerciais que se estabeleciam naquela época. O seu comércio se intensificou e foi ganhando o mundo. Hoje o chá é consumido em todo o planeta.

O chá verde é um tipo de chá feito a partir da infusão da erva *Camellia sinensis*, uma planta da família Theaceae. Conhecida popularmente por chá verde, chá da Índia ou *green tea*, suas folhas possuem cerca de 30% de compostos polifenólicos, principalmente -(-)epicatequinas, cuja principal propriedade terapêutica é a de antioxidante (Simões, Schenkel *et al.*, 2004). Além dessa propriedade, possui reconhecida atividade antiinflamatória, antimicrobiana e hepatoprotetora. Segundo Duarte e Menarim (2006), a comercialização dessa espécie é relevante, como droga farmacognóstica e insumo na indústria de bebidas.

A denominação “verde” é atribuída porque as folhas da erva sofrem pouca oxidação durante o processamento, o contrário do que acontece com as folhas do chá preto. Outras ervas são vendidas como chá verde, porém o verdadeiro, é o feito a partir das folhas do arbusto *Camellia sinensis*. Sua composição química inclui diversas classes de compostos flavonoides, dentre elas as catequinas, que apresentam importante propriedade antioxidante. Além destes, estão presentes a cafeína, os pigmentos, os carboidratos, os aminoácidos e certos micronutrientes

como as vitaminas (B, E e C). Minerais como o cálcio, o magnésio, o zinco, o potássio e o ferro, completam esse rico composto (PIETTA, 2000).

5 Neuroproteção e Catequinas

A neuroproteção pode ser definida como uma intervenção, não necessariamente farmacológica, para interferir diretamente nos mecanismos intracelulares da cascata isquêmica, visando o resgate da área de hipoperfusão, ainda viável, circunjacente ao infarto (área de necrose). Engloba as medidas que melhoram o suprimento sanguíneo para o tecido e aquelas que aumentam a viabilidade da célula diante da circulação diminuída (ZAGER; AMES, 1988; FREITAS et al., 2005).

Dentre as diversas substâncias caracterizadas por suas ações neuroprotetoras devido ao papel antioxidante que exercem, destacam-se os flavonóides. Flavonóides são grupos de compostos polifenólicos que não podem ser sintetizados pelo metabolismo humano e, portanto são adquiridos através da alimentação. Eles são formados nas plantas pela combinação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina com unidades acetato (PETERSON; DWYER, 1998; COTELLE, 2001). De acordo com Senger, Schwanke e Gottlieb (2010), os monômeros de catequinas são os principais flavonóides presentes no chá verde. Esses monômeros são potentes antioxidantes *scavengers* de radicais livres, quelantes de metais e inibidores da lipoperoxidação. Suas propriedades estão relacionadas com a presença, em sua estrutura, de radicais ligados aos seus anéis. A presença de grupos hidroxil na posição carbono 3 do anel C, de dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel C e o número de radicais hidroxil ligados nos anéis A e B, aumentam sua atividade antioxidante (COOK; SAMMAN, 1996; ANGHILERI; THOUVENOT, 2000)

A composição das catequinas presente na folhas da *Camellia sinensis* inclui a epicatequina (EC), a epigalocatequina (EGC), a galato-3-epicatequina (ECG) e a galato-3-epigalocatequina (EGCG). Elas correspondem há aproximadamente 26,7% dos compostos presentes no chá verde, das quais 11% são constituídos de EGCG, 10% de EGC, 2% de ECG, 2,5% EC e 15% de polifenóis não identificados. O potencial quimioprotetor/antioxidante das frações das catequinas do chá verde

apresenta a seguinte ordem decrescente de eficiência: EGCG = ECG > EGC = EC (RICE-EVANS et al., 1996).

Quanto ao metabolismo e a biotransformação das catequinas, em estudos realizados por Chen et al. (1997) foi demonstrado que a EGCG é a mais rapidamente absorvida e distribuída por todos os tecidos por possuir um tempo de meia-vida maior. No entanto, quando administrada isoladamente, não associada a outros compostos do chá verde, apresenta tempo de meia-vida menor. Os mesmos autores relatam que esta propriedade está relacionada com a sua complexação, competição, metabolização e interação com os demais compostos do chá verde.

Foram avaliadas as características de absorção, biodisponibilidade e eliminação das três catequinas do chá verde (EC, ECG e EGCG) (ZHU, et al., 2000), e para tanto, os autores utilizaram ratos Sprague-Dawley que receberam extrato de chá verde por via oral (5000 mg/kg). Os resultados indicaram concentração plasmática máxima de catequinas de 15-112 mg/mL, 2 horas após o aporte oral. A meia vida de eliminação das catequinas foi de, aproximadamente, 8 horas. Lee et al. (2002), relataram tempos de meia-vida de 3 a 4 horas para EGCG e, 2 horas para EC/EGC. Os autores mostraram que, no plasma, a EGCG estava presente principalmente na forma livre, enquanto a EGC e a EC apareciam na forma conjugada, e que, além disso, todas as catequinas foram excretadas em 8 horas. Os autores concluíram que a baixa disponibilidade sistêmica dos compostos poderia resultar da absorção lenta, juntamente com um efeito elevado de primeira passagem no fígado e sua ampla distribuição nos tecidos periféricos.

A avaliação da biodisponibilidade das catequinas em humanos foi estudada utilizando uma preparação contendo 15 mg de EGC, 36 mg de EC, 16 mg de EGCG e 31 mg de ECG, cuja concentração foi determinada por HPLC (*high-performance liquid chromatography*) nos tempos 0, 2, 4 e 6 horas. Concentrações plasmáticas de EGC, EC e EGCG apresentaram picos em 5 horas, sendo 1,68% das catequinas ingeridas detectadas no plasma. Os autores concluíram que, a baixa biodisponibilidade das catequinas deve-se provavelmente à rápida metabolização e difusão pelos tecidos (WARDEN et al., 2001). Lee et al. (2002), ainda relataram que, as catequinas são bem absorvidas pelo trato digestivo, pois não são encontradas quantidades significativas nas fezes de pacientes estudados.

A ação antioxidante das catequinas pode ser elucidada através da capacidade de transferência de elétrons para as espécies reativas do oxigênio (ERO), promovendo a estabilização dessas substâncias. Skrzydlewska et al. (2002), estudaram *in vitro* um sistema contendo plasmídio (DNA) e substância geradora de radicais livres que causariam lesão ao DNA. Foram utilizadas catequinas como *scavengers* de radicais livres e dentre as catequinas (EC; EGC; ECG e EGCG), o EGCG foi o composto mais efetivo como antioxidante na proteção do DNA.

Mandel et al. (2005), comprovaram o papel neuroprotetor das catequinas do chá verde em modelos animais de doenças neurodegenerativas frente à toxicidade das substâncias N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (modelo de Doença de Parkinson) e peptídeo β -amilóide (modelo de Doença de Alzheimer). Também observaram efeito protetor na isquemia cerebral unilateral ou global, e ainda em modelos de estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio.

Etus et al. (2003), comprovaram a importância da galato-3-epigallocatequina (EGCG) na prevenção do dano oxidativo na camada branca periventricular em filhotes de ratos com hidrocefalia induzida por caulim. Neste estudo foi demonstrado que os animais hidrocefálicos tratados com uma única dose diária de EGCG (50mg/kg) injetada peritonealmente durante 15 dias apresentaram níveis de malondialdeído significativamente inferiores aos animais hidrocefálicos não tratados, inferindo menor formação de peroxidação lipídica e ação de radicais livres. No entanto, neste estudo os autores investigaram o potencial neuroprotetor da catequina limitando-se apenas à análise bioquímica.

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

O diagnóstico de hidrocefalia é evidente quando há expansão ventricular reconhecida nos exames de neuroimagens em pacientes que recorrem aos serviços de urgência apresentando a tríade de sintomas do aumento da pressão intracraniana (náuseas, vômitos e cefaléia). No entanto, o diagnóstico e a decisão do tratamento nem sempre são tão claros. Muitas vezes, encontram-se dificuldades para diferenciar hidrocefalia progressiva de hidrocefalia compensada em crianças aparentemente assintomáticas.

O tratamento desta doença consiste na derivação da circulação liquórica através de processo cirúrgico, seja através da implantação de sistemas de derivação (*shunt*), seja através de terceiroventriculostomia. No entanto, sabe-se que existem grandes dificuldades em se estabelecer o momento exato desta intervenção devido à possibilidade de estabilização espontânea da dilatação ventricular. Por outro lado, alguns pacientes necessitam de intervenção imediata sem, no entanto, apresentarem condições para a intervenção cirúrgica devido a problemas clínicos graves (infecções, cardiopatias, déficits imunológicos severos, etc.). Durante este período de espera, poderão surgir sérias lesões no cérebro em consequência da isquemia, da peroxidação lipídica e da crescente formação de radicais livres. A busca, portanto, de drogas ou manobras de proteção ao tecido nervoso devem fazer parte dos estudos de hidrocefalia.

OBJETIVO

OBJETIVO

Nosso objetivo com este trabalho, foi demonstrar os possíveis efeitos neuroprotetores provenientes dos polifenóis antioxidantes, especificamente da galato de epigallocatequina (EGCG), extraídos da *Camellia sinensis* (chá verde) em diferentes regiões e estruturas encefálicas, através de avaliações comportamentais e estudos histopatológicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1 Animais

Foram utilizadas ninhadas de ratos albinos 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 machos, transportados em uma única caixa alojamento, no dia do nascimento, para o Biotério da Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Durante a permanência dos animais no biotério, dieta padrão de laboratório para roedores e água foram oferecidas *ad libitum* às mães.

2 Grupos experimentais

- ▶ Grupo 1 (H10): ratos com hidrocefalia, sacrificados com 17 dias de vida (10 dias após a injeção de caulim).
- ▶ Grupo 2: (H21): ratos com hidrocefalia, sacrificados com 28 dias de vida (21 dias após a injeção de caulim).
- ▶ Grupo 3 (HT10): ratos com hidrocefalia tratados com injeção diária de polifenol após a indução da hidrocefalia, sacrificados com 17 dias de vida (10 dias após a injeção de caulim).
- ▶ Grupo 4 (HT21): ratos com hidrocefalia tratados com injeção diária de polifenol após a indução da hidrocefalia, sacrificados com 28 dias de vida (21 dias após a injeção de caulim).
- ▶ Grupo 5 (C10): ratos não submetidos à hidrocefalia, sacrificados com 17 dias de vida.
- ▶ Grupo 6 (C21): ratos não submetidos à hidrocefalia, sacrificados com 28 dias de vida.

3 Indução da hidrocefalia

Com sete dias de idade, os filhotes foram submetidos à indução da hidrocefalia pelo método da injeção intracisternal de caulim a 20%. Cada animal foi posicionado por um auxiliar, que segurou a cabeça com uma mão e o corpo com a outra mão e flexionou o pescoço do animal, deixando livre a região cervical dorsal (Figura 1). Através da palpação, foi identificado o espaço entre a borda dorsal 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 percutânea, e injetado, por injeção lenta, 0,04ml de uma suspensão de caulim (Merck®) a 20% em água destilada. Um ou dois ratos de cada ninhada não foi puncionado, sendo identificado para ser usado como animal controle. A seguir, os animais foram recolocados em sua caixa alojamento de origem, retornando ao Biotério.

Figura 1 – Fotografia do método de indução da hidrocefalia. Posicionamento do animal por um auxiliar, e injeção do caulim na cisterna magna.

4 Administração do derivado polifenólico

O extrato utilizado foi cedido pelo Laboratório de Biologia de Fungos do Centro de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) Ilhéus-BA, e foi obtido a partir de partes de *Camellia spp*, especificamente,

de folhas de *Camellia sinensis* L. var. *assamica* (cultivar IAC – 259), safra: verão/2011, através do método a frio compreendendo uma etapa de liofilização (BERGOLD et al., 2009). O composto obtido é um extrato rico em catequinas tais como galato de epigallocatequina (EGCG), catequina epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG) e galato de galocatequina (GCG). A dosagem específica dos teores para cada catequina foi quantificada através de cromatografia líquida de alto desempenho - HPLC (*high-performance liquid chromatography*), sendo os valores: EGCG = 15,40%, Cafeína = 9,29%, ECG = 6,64% e EC = 3,12%. O extrato foi fracionado em porções de 100mg cada e armazenado em eppendorfs de 1,5 ml. A diluição do extrato em soro fisiológico (100 mg/ml) ocorria apenas no momento da administração da injeção. A homogeneização da solução foi facilitada pelo uso do Vortex QL- 901 (Biomixer). Os animais pertencentes aos grupos HT10 e HT21 receberam diariamente, a partir do segundo dia de indução da hidrocefalia, dose única do extrato na quantidade de 50 mg/kg de EGCG via intraperitoneal (ETUS et al., 2003).

5 Estudos comportamentais

Os animais foram pesados diariamente. Para estudo do desenvolvimento sensoriomotor, o comportamento deambulatório foi avaliado a cada 2 dias, a partir do 5º dia após a injeção (P5). Cada animal foi observado individualmente em uma arena de acrílico transparente de 60 cm de lado e 45 cm de altura (Figura 2), 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 (LOPES et al., 2009). Para iniciar a observação, cada animal era seguro pela pele do dorso e colocado no centro da arena. Ao final de 2 minutos, o animal era retirado. O assoalho e as paredes da arena eram limpos com papel toalha embebidos em água e sabão neutro entre a avaliação de um e outro animal. As observações foram realizadas durante o dia, aproximadamente no mesmo horário.

Foram ainda submetidos a um teste de memória, em um labirinto em T, nos dias 9 (P9), 14 (P14) e 20 (P20) após a injeção do caulim, em 5 sessões sequenciais em 2 turnos no mesmo dia (Figura 3). No dia anterior ao primeiro teste, foi realizado um treinamento de escolha de um braço específico do labirinto. Foi avaliada a capacidade de memorização, na rotina de escolha de um braço específico do T, através da quantificação do tempo gasto desde a antecâmara do braço maior até o alcance final do braço específico.

Observação: o dia da indução da hidrocefalia (ou da idade correspondente dos controles) foi denominado P0, e os dias subsequentes numerados a partir de então (P1, P2, etc.).

Figura 2 – Fotografia de rato controle com 14 dias de vida executando teste de comportamento em campo aberto.

Figura 3 - Fotografia de rato com 9 dias de hidrocefalia (16 dias de vida) executando teste de memória no labirinto em T.

6 Coleta das amostras

Os animais de cada grupo foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina 10% e xilasina 10% (nas doses de 0,1 e 0,05 mg/100g de peso corporal). Após posicionamento em mesa cirúrgica, em decúbito dorsal, foi realizada uma ampla incisão em “Y” no tórax, das clavículas até o apêndice xifóide e, no abdome, incisão mediana xifo-púbica. Com uma agulha calibre 12, foi puncionada a ponta do ventrículo cardíaco esquerdo, introduzindo-a até a raiz da aorta. Após uma pequena incisão na aurícula direita, foi iniciada a perfusão transcardíaca com solução salina até o clareamento do líquido de saída (cerca de 1 ml/g de peso do animal), com auxílio de uma bomba de perfusão peristáltica (Fisher Scientific). A seguir, os animais foram decapitados e seus encéfalos retirados em bloco através de uma craniectomia de vértex. As amostras foram imersas em uma solução fixadora de paraformaldeído 3% diluído em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3 – 7,4) por 24 horas à temperatura de 4°C, sendo posteriormente trocadas por uma nova solução, idêntica à anterior, permanecendo nesta por 7 dias à mesma temperatura. A seguir, os encéfalos foram seccionados no plano coronal, dividindo o cérebro em uma porção anterior (frontal) e outra posterior (parietal), tomando-se como referencial o quiasma óptico. As porções anterior e posterior foram mantidas na mesma solução fixadora de paraformaldeído 3% por mais 7 dias. A seguir, foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (50% a 100%) diafanizadas em xilol

e emblocadas em parafina. As porções anteriores foram cortadas coronalmente em micrótomo rotativo em secções de 5µm de espessura e seus cortes estendidos em lâminas histológicas. As porções posteriores permaneceram emblocadas para eventuais estudos futuros.

7 Estudos histopatológicos

Histologia

As lâminas foram mantidas em estufa (60°C) por uma hora para derretimento da parafina. Em seguida, os cortes foram submetidos ao processo de desparafinização, seguidos de banhos sequenciais de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água; posteriormente, foram corados com hematoxilina-eosina ou solocromo-cianina (cada amostra foi corada com ambas as colorações). Foram observadas, com a hematoxilina e eosina, a citoarquitetura geral, distribuição das estruturas e densidade celular. Com a coloração solocromo-cianina, foram avaliados o grau de mielinização da substância branca periventricular e a medida da espessura do corpo caloso.

Imunoistoquímica

GFAP (glial fibrillary protein)

Os cortes foram estendidos em lâminas histológicas gelatinizadas e desparafinizados em estufa a 58°C – 62°C, seguidos de banhos de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% em metanol e sucessivos banhos em PBST 0,2% (PBS + Triton X-100) e PBS 1X. Posteriormente realizou-se o bloqueio com soro de cabra 10% diluído em PBS e a deposição das lâminas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o escorrimento, para a retirada do bloqueio, foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-GFAP (DAKO Z0334, Dinamarca), diluído 1:6.000 em BSA (albumina de soro bovino), “overnight” à temperatura de 4 °C. Retirado o anticorpo primário, através de escorrimento e lavagem com esguicho de PBS, foram realizados novos banhos em PBST 0,2% e PBS. A seguir os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado (cabra anti-coelho; Santa Cruz Biotechnology SC-2040) diluído 1:300 em

BSA e mantidos em câmara úmida por 2 horas à temperatura ambiente . Após novos banhos com PBST 0,2% e PBS, foram incubados com o anticorpo terciário streptovidina HRP (Thermo Scientific JG 122591) diluído 1:400 em PBS à temperatura ambiente. Após outros novos banhos com PBST 0,2% e PBS, foram revelados com DAB (3,3'- diaminobenzidina) (Sigma), por 1 minuto (previamente testado) à temperatura ambiente, seguidos de lavagem em água corrente. Por fim, as lâminas foram submetidas à contracoloração com hematoxilina, lavadas em água corrente, desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de alcoóis e xilol, e recobertas por lamínulas montadas com Permount®.

Ki67

Os cortes estendidos em lâminas histológicas gelatinizadas desparafinizadas em estufa a 58°C – 62°C, foram submetidos a banhos de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água. A recuperação antigênica foi realizada com aquecimento em forno microondas por 20 minutos em potência baixa com ácido cítrico 0,01 M/pH=6,0 preaquecido. Para tanto, as lâminas eram acondicionadas em copo plástico tipo “Coplin”. Após resfriamento em temperatura ambiente e lavagem com água destilada, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% em metanol, seguido de sucessivos banhos em PBST 0,2% (PBS + Triton X-100) e PBS. O bloqueio nos cortes foi realizado com soro de cabra 1% em PBS em câmara úmida. Logo após, foram incubados com o anticorpo monoclonal primário de camundongo anti-Ki67 (NCL-Ki67-MM1, Leica, Reino Unido), diluído 1:500 em BSA (albumina de soro bovino), “overnight” à temperatura de 4 °C. Através de escurimento e lavagem com esguicho de PBS, foi retirado o anticorpo primário e adicionado o anticorpo secundário biotilado (cabra anti-camundongo; Santa Cruz Biotechnology SC-2039), diluído 1:300 em PBS à temperatura ambiente. Após novos banhos com PBST 0,2% e PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo terciário streptovidina HRP (Thermo Scientific JG 122591) diluído 1:400 em PBS à temperatura ambiente. Após outros novos banhos com PBST 0,2% e PBS, foram revelados com DAB (3,3'- diaminobenzidina) (Sigma), por 2 minutos (previamente testado) à temperatura ambiente, seguidos de lavagem em água corrente. Por fim, as lâminas foram submetidas à contracoloração com hematoxilina, lavadas em água corrente, desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de alcoóis e xilol, e recobertas por lamínulas montadas com Permount®.

8 Documentação fotográfica e análise morfométrica

A documentação fotográfica das lâminas foi realizada no laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, através de um microscópio de luz AxiosKop2 plus (Carl Zeiss) e uma câmera digital AxioCam Hrc (Carl Zeiss) acoplados a um computador Pentium II equipado com o software Axio Vision 3.1, utilizando a objetiva de 40x.

Para as lâminas coradas com solocromo-cianina, foi fotografada a região do corpo caloso e realizada a medição da sua espessura.

Nas lâminas imunomarcadas por GFAP foram fotografadas as regiões do córtex cerebral, corpo caloso, matriz germinativa e cápsula externa, onde foram feitas a contagem dos astrócitos reativos. Já as lâminas imunomarcadas por Ki67 foram fotografadas apenas a região da matriz germinativa, área de intensa proliferação celular, onde foi feita a contagem das células em divisão mitótica.

A realização da contagem de células nas fotografias das lâminas imunomarcadas pelo GFAP e Ki67, bem como a medição da espessura do corpo caloso nas fotografias das lâminas coradas com solocromo-cianina foram realizadas com o auxílio do programa de computador ImageJ (NIH).

9 Análise estatística

Para análise estatística do ganho de peso corporal, tempo do Labirinto em T, astrócitos marcados pelo GFAP (nas regiões do corpo caloso, cápsula externa, córtex cerebral, matriz germinativa), células em divisão celular marcados por Ki67 (na região da matriz germinativa) e medição da espessura do corpo caloso em lâminas coradas com solocromo-cianina, utilizou-se a análise de variância ANOVA (um critério), seguido do pós-teste de Tukey-Kramer. Para análise dos testes comportamentais *Open Field* e acertos do Labirinto em T, utilizou-se a análise de variância Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. A diferença estatística significativa foi considerada quando $p < 0.05$. Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do programa BioEstat (versão 5.3) cedido gratuitamente pelo Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá.

RESULTADOS

RESULTADOS

Cinquenta e seis animais foram usados para compor os grupos experimentais, assim distribuídos: 11 animais no grupo H10; 17 animais no grupo H21; 8 animais no grupo HT10, 10 animais no grupo HT21; 5 animais no grupo C10 e 5 animais no grupo C21.

1 Observação clínica e comportamental

Aspectos clínicos e comportamentais foram observados diariamente após a indução da hidrocefalia. Os animais gravemente afetados apresentavam macrocrania, abaulamento da abóbada craniana, posicionamento rebaixado dos olhos, semelhante ao de crianças hidrocefálicas (“olhar de sol poente”), letargia e marcha com base alargada e nas pontas dos dedos; no dorso apresentavam uma curvatura cifótica acentuada semelhante ao aspecto de uma corcunda (Figura 4).

Os animais, durante a avaliação do comportamento geral na arena de campo aberto exploravam o ambiente de forma horizontal e vertical. No modo horizontal o animal percorria os quatro vértices da arena margeando as suas paredes sucessivas vezes. Quando já ambientado e mais seguro, o animal realizava deslocamentos perpendiculares às paredes da arena, atravessando o campo de um lado para o outro. Ocasionalmente, realizavam também giros de 180° sobre o eixo longitudinal do próprio corpo. A exploração vertical ocorria quando o animal elevava-se nas patas dianteiras, ficando elas livres ou apoiadas nas paredes da arena, permanecendo apenas as traseiras apoiadas no assoalho. Além disso, os ratos apresentavam o ato de coçar-se ou cuidar da higiene corporal, além de defecar e urinar pela arena com o fim de demarcar território. Este comportamento descrito era apresentado pelos animais controles, especialmente nas observações durante o período mais tardio de desenvolvimento. Entretanto, os animais com hidrocefalia apresentavam menor nível de exploração e movimentação pela arena, tendendo a permanecer apáticos e inertes por mais tempo que os controles. Ademais, os controles quase que imediatamente após serem colocados no centro da arena apresentavam evacuações, já os hidrocefálicos apenas exibiram esse comportamento mais tardiamente no período de observação.

Figura 4 - Fotografia de rato hidrocefálico com 14 dias de evolução da doença. Observar o abaulamento da abóbada craniana, os pelos eriçados na região da cabeça e o posicionamento rebaixado dos olhos.

2 Avaliação do peso corporal

Todos os animais foram pesados diariamente, por 21 dias, após a injeção de caulim para indução da hidrocefalia. A evolução do ganho de peso dos grupos estudados com suas respectivas médias compreendendo o período de 0 a 21 dias pós-injeção de caulim estão representadas na figura 5.

A observação comparada entre os grupos controle e hidrocefálicos mostrou não haver diferença significativa entre eles desde P0 até o final do experimento, embora tenha havido uma tendência de maior ganho de peso nos animais do grupo controle.

Já a comparação entre os grupos controle e hidrocefálico tratado e, hidrocefálico e hidrocefálico tratado, demonstrou diferença significativa ($p < 0.05$) de P0 a P21; nos dois casos, com menor ganho de peso nos animais hidrocefálicos que receberam o polifenol.

Figura 5. Representação gráfica do ganho de peso diário (média) dos animais controles (C); hidrocefálicos (H) e hidrocefálicos tratados com polifenol EGCG (HT).

3 Avaliação comportamental

Open Field (Campo Aberto)

Para estudo do desenvolvimento sensoriomotor e comportamento deambulatorio, os animais foram avaliados a cada 2 dias, a partir do dia 5 após a injeção de caulim até ao final do experimento.

Apenas no segundo dia do teste (P7) houve diferença significativa entre os grupos controle e hidrocefálico tratado, com pior desempenho dos animais com hidrocefalia tratados com o polifenol ($p < 0.05$). Os resultados referentes à média entre ambos os grupos estão demonstrados na figura 6. As demais comparações entre os grupos, nos demais tempos de aplicação do teste, não apresentaram diferenças significativas. Apesar disso, foi observada do dia P13 ao dia P21 uma tendência a maior pontuação no grupo hidrocefálico tratado quando comparado aos demais grupos.

Figura 6. Gráfico representativo do desempenho no teste de campo aberto no sétimo dia após a indução com caulim (P7). Controles (C); hidrocefálicos (H) e hidrocefálicos tratados com polifenol (HT). * $p < 0.05$

T-Maze (Labirinto em T)

A avaliação da capacidade de memorização dos animais foi realizada através da contabilização dos acertos a um braço específico do T e a quantificação do tempo gasto desde a antecâmara do braço maior até ao alcance final do braço específico. Os testes foram aplicados em três tempos distintos após a injeção do caulim, especificamente no 9º, 14º e 20º dias em dois turnos no mesmo dia com intervalo mínimo de seis horas entre os turnos em cinco sessões sequenciais cada um.

Acertos

Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais em qualquer dos tempos de evolução da hidrocefalia em ambos os períodos avaliados (manhã e tarde).

Tempo

Os resultados referentes à média e respectivos erros padrões da média da variável tempo de deslocamento gasto entre a antecâmara do braço maior até ao alcance final do braço específico do labirinto T entre os grupos controles, hidrocefálicos e hidrocefálicos tratados são observados na tabela 1. Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos testados em qualquer dos tempos de evolução da hidrocefalia.

Tabela 1: Comparação entre as médias dos grupos experimentais referente ao tempo gasto para alcançar o braço específico do T. Controles (C); hidrocefálicos (H) e hidrocefálicos tratados com polifenol (HT).

Grupos	Manhã			Tarde		
	P9	P14	P20	P9	P14	P20
C	38.82 (±5.28)	40.16 (±7.20)	32.28 (±4.39)	38.62 (±5.67)	45.32 (±7.38)	28.92 (±5.26)
H	42.75 (±2.79)	32.42 (±3.56)	27.95 (±3.56)	38.82 (±2.89)	32.23 (±4.11)	24.60 (±3.16)
HT	46.24 (±2.74)	36.60 (±4.13)	38.74 (±4.44)	44.53 (±2.09)	34.86 (±3.60)	32.24 (±2.82)

4 Análise histopatológica

Coloração com hematoxilina-eosina (HE)

Através dos cortes de encéfalos corados com hematoxilina e eosina foram observadas a citoarquitetura geral, a distribuição das estruturas e a densidade celular em diferentes regiões e estruturas encefálicas (Figura 7).

Figura 7. Fotomicrografias do encéfalo de rato controle (17 dias de vida) com demarcações em algumas das regiões onde foram analisadas a citoarquitetura geral. (A) corpo caloso. (B) cápsula externa. (C) córtex cerebral. (D) matriz germinativa. Coloração: hematoxilina e eosina. Objetiva de 5X. Barra: 0,2 mm.

As alterações analisadas nos encéfalos de todos os grupos foram encontradas especialmente nas quatro regiões demarcadas na figura 7. Os cortes com essa coloração nos animais controles (C10 e C21) mostraram que o corpo caloso apresentava-se íntegro e a camada endimária que recobria os ventrículos laterais era contínua, com epitélio cúbico simples e células endimárias com núcleo centralizado (Figura 8-A e B). Observou-se que o corpo caloso nos animais pertencentes ao grupo H10 e H21 com dilatação ventricular discreta apresentava edema leve e mínimos sinais de esgarçamento em suas fibras, com a camada endimária exibindo roturas em pontos isolados e pequenas áreas de desnudamento (Figura 8-C e D). No entanto, os animais pertencentes aos mesmos grupos experimentais apresentando dilatação ventricular grave, exibiam edema pronunciado, fortes sinais de esgarçamento em suas fibras e o corpo caloso e o epêndima muitas vezes totalmente destruídos (Figura 8-E e F).

Figura 8. Fotomicrografias do corpo caloso de ratos com 17 e 28 dias de vida (10 e 21 dias pós-injeção de caulim, respectivamente): (A) C10. (B) C21. (C) H10 (dilatação discreta). (D) H21 (dilatação discreta). (E) H10 (dilatação grave). (F) H21 (dilatação grave). Pode se observar camada ependimária íntegra (setas), edema leve (círculos), desnudamento ependimário (cabeças de seta), esgarçamento (estrelas) e edema severo (quadrados). Coloração: hematoxilina eosina. Objetiva de 40X. Barra: 20 µm.

As alterações encontradas na região da cápsula externa foram muito semelhantes àsquelas encontradas no corpo caloso, ou seja, as alterações mais graves foram encontradas nos animais que apresentaram hidrocefalia grave. Nesses animais, independentes da idade, foram encontrados sinais de edema e esgarçamento mais severos que naqueles com dilatação discreta (Figura 9). Já no córtex cerebral, observou-se leve edema nos animais com dilatação discreta e grave

em ambas as idades. Não foram encontrados sinais de esgarçamentos nessa região em nenhum dos animais.

Figura 9. Fotomicrografias da cápsula externa (quadros superiores) e córtex cerebral (quadros inferiores) de ratos com 17 dias de vida (10 dias pós-injeção de caulim): (A) C10. (B) H10 (dilatação discreta). (C) H10 (dilatação grave). (D) C10. (E) H10 (dilatação discreta). (F) H10 (dilatação grave). Coloração: hematoxilina eosina. Pode se observar edema leve (círculos) e esgarçamento (estrelas). Objetivas: cápsula externa (20X. Barra: 50 µm), córtex cerebral (40X. Barra: 20 µm).

Na região da matriz germinativa, localizada no ângulo externo dos ventrículos laterais (área de intensa proliferação celular), foi analisada especialmente a quantidade de células migratórias (celularidade). Observa-se na figura 10 que a celularidade era mais intensa quanto mais jovem era o animal e menor a sua dilatação ventricular.

Figura 10. Fotomicrografias da matriz germinativa de ratos com 17 e 28 dias de vida (10 e 21 dias pós-injeção de caulim, respectivamente): (A) C10. (B) C21. (C) H10 (dilatação discreta). (D) H21 (dilatação discreta). (E) H10 (dilatação grave). (F) H21 (dilatação grave). Coloração: hematoxilina eosina. Objetiva de 20X. Barra: 50 µm. *células em divisão mitótica na região da matriz germinativa.

Coloração com solocromo-cianina

Na confrontação visual do corpo caloso dos ratos controles (C10 e C21) observou-se intenso reforço na tonalidade azul com o correr do tempo, indicando progressiva mielinização dessa estrutura (11-A e B). Os animais hidrocefálicos (H10 e H21) apresentavam corpo caloso acentuadamente menos corado em azul que seus respectivos controles (figura 11-A, B, C e D). Já os animais pertencentes aos grupos HT10 e HT21 apresentaram menor intensidade da cor azul que os controles,

porém maior intensidade nessa coloração quando comparados aos animais hidrocefálicos sem tratamento (Figura 11-C, D, E F).

Na figura 12 estão representadas as médias referentes à medição da espessura do corpo caloso nos diferentes grupos experimentais. Na comparação entre os grupos C10 e H10 observou-se maior espessura do corpo caloso nos animais controles. Já na comparação entre os grupos H10 e HT10 foi encontrada maior espessura do corpo caloso nos animais tratados com o polifenol. Todas essas comparações apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$). Houve também diferença significativa entre os grupos H10 e H21, com os animais mais jovens apresentando menor espessura dessa estrutura.

Figura 11. Fotomicrografias do corpo caloso de ratos com 17 e 28 dias de vida (10 e 21 dias pós-injeção de caulim, respectivamente): (A) C10. (B) C21. (C) H10. (D) H21. (E) HT 10. (F) HT21. Coloração: solocromo-cianina. Objetiva de 10X. Exposição de luz: 90.0 ms. Barra: 100 µm. (*) corpo caloso

Figura 12. Gráfico representativo da medição da espessura do corpo caloso nos diferentes grupos experimentais. * $p < 0.05$

Estudo imunoistoquímico do GFAP

Pelo método imunoistoquímico para o anticorpo GFAP foram observados e contabilizados os astrócitos reativos imunomarcados em quatro regiões distintas: corpo caloso, cápsula externa, córtex cerebral e matriz germinativa.

Na figura 13, 15, 17 e 19 os quadros perfilados na linha superior e inferior representam os animais com 17 e 28 dias de vida, respectivamente.

Corpo caloso

Notou-se que os animais dos grupos C10 e C21 (Figura 13-A e D) não apresentavam astrócitos reativos perceptíveis na região específica; ao contrário dos animais dos grupos H10 e H21 (Figura 13-B e E) que exibiam astrócitos intensamente marcados, com seus prolongamentos mais grosseiros. Já os animais dos grupos HT10 e HT21 (Figura 13-C e F) também apresentavam imunomarcagem para essas células, porém mais discreta e com prolongamentos astrocitários mais finos.

As médias referentes à densidade de astrócitos reativos encontradas no corpo caloso dos diferentes grupos experimentais estão representadas na figura 14. Foram encontradas diferenças significativas quando comparados os grupos hidrocefálicos com os seus respectivos controles (H10 x C10 e H21 x C21); com menor densidade astrocitária exibida nos animais controles dos dois grupos. Quando comparados os grupos H10 e HT10, a densidade de astrócitos foi significativamente menor nos animais que receberam o polifenol.

Figura 13. Fotomicrografias do corpo caloso com imunomarcção para o GFAP de ratos com 17 e 28 dias de vida (10 e 21 dias pós-injeção de caulim, respectivamente): (A) C10. (B) H10. (C) HT10. (D) C21. (E) H 21. (F) HT21. Objetiva de 40X (imersão). Barra: 20 µm.

Astrócitos reativos - corpo caloso

Figura 14. Gráfico representativo da densidade de astrócitos imunomarcados pelo anticorpo GFAP na região do corpo caloso nos diferentes grupos experimentais. * $p < 0.05$

Cápsula externa

Nesta região observou-se astrócitos reativos intensamente imunomarcados apenas no grupo H10 (Figura 15-B). Nos demais grupos com ambas as idades observou-se um padrão uniforme de discreta imunomarcção caracterizada por astrócitos delicados com seus prolongamentos finos (Figura 15).

A figura 16 exibe a comparação das médias entre os grupos experimentais referentes à densidade de astrócitos reativos. Houve diferença significativa apenas entre os animais com 17 dias de vida, com maior densidade apresentada pelo grupo H10 quando comparada com os grupos C10 e HT10 (Figura 16).

Figura 15. Fotomicrografias da cápsula externa com imunomarcção para o GFAP de ratos com 17 e 28 dias de vida (10 e 21 dias pós-injeção de caulim, respectivamente): (A) C10. (B) H10. (C) HT10. (D) C21. (E) H 21. (F) HT21. Objetiva de 40X (imersão). Barra: 20 µm.

Astrócitos reativos - cápsula externa

Figura 16. Gráfico representativo da densidade de astrócitos imunomarcados pelo anticorpo GFAP na região da cápsula externa nos diferentes grupos experimentais. * $p < 0.05$

Córtex cerebral

A figura 17 apresenta padrão homogêneo dos cortes da região do córtex cerebral em todos os grupos experimentais. Nos animais hidrocefálicos com ambos os tempos de evolução da hidrocefalia (H10 e H21) observou-se discreta marcação de astrócitos com prolongamentos finos e curtos.

Embora não tenha havido nenhuma diferença significativa na análise de comparação entre os grupos, notou-se que, as médias do grupo HT10 e HT21 foram menores em relação às medias dos grupos H10 e H21 quando comparados os grupos com o mesmo tempo de evolução da doença (Figura 18).

Figura 17. Fotomicrografias do córtex cerebral com imunomarcção para o GFAP de ratos com 17 e 28 dias de vida (10 e 21 dias pós-injeção de caulim, respectivamente): (A) C10. (B) H10. (C) HT10. (D) C21. (E) H 21. (F) HT21. Objetiva de 40X (imersão). Barra: 20 µm.

Astrócitos reativos - córtex cerebral

Figura 18. Gráfico representativo da densidade de astrócitos imunomarcados pelo anticorpo GFAP na região do córtex cerebral nos diferentes grupos experimentais.

Matriz germinativa

Observou-se que a imunomarcagem dos astrócitos nessa região foi mais intensa nos animais pertencentes aos grupos H10 e H21 (Figura 19-B e E). Nos demais grupos, a saber, nos animais controles (C10 e C21) e hidrocefálicos tratados (HT10 e HT21) a marcação dessas células foi bastante discreta, dificultando a observação clara dos prolongamentos astrocitários (Figura 19).

A comparação entre os grupos controles e hidrocefálicos (C10 x H10 e C21 x H21) demonstrou densidade astrocitária significativamente maior nos animais com hidrocefalia. A mesma observação apareceu na comparação entre os grupos hidrocefálicos e hidrocefálicos tratados (H10 x HT10 e H21 x HT21), onde os animais que receberam injeções de polifenol apresentaram menor densidade de astrócitos reativos. Os resultados referentes às médias entre os grupos analisados são observados na figura 20.

Figura 19. Fotomicrografias da matriz germinativa com imunomarcção para o GFAP de ratos com 17 e 28 dias de vida (10 e 21 dias pós-injeção de caulim, respectivamente): (A) C10. (B) H10. (C) HT10. (D) C21. (E) H 21. (F) HT21. Objetiva de 40X (imersão). Barra: 20 µm.

Astrócitos reativos - matriz germinativa

Figura 20. Gráfico representativo da densidade de astrócitos imunomarcados pelo anticorpo GFAP na região da matriz germinativa nos diferentes grupos experimentais. * $p < 0.05$

Estudo imunoistoquímico do Ki67

Pelo método imunoistoquímico para o anticorpo Ki67 foram observadas e contabilizadas as células em divisão mitótica imunomarcadas na região da matriz germinativa, localizada no ângulo externo dos ventrículos laterais do cérebro (região de intensa proliferação celular).

Na figura 21 é possível observar intensa imunomarcção nos quadros A e D referentes aos animais pertencentes aos grupos C10 e C21. A comparação visual entre os grupos hidrocefálicos e hidrocefálicos tratados com ambos os tempos de evolução da hidrocefalia, exibiu imunomarcção com padrão semelhante, todavia com menor intensidade quando comparada aos respectivos grupos controles.

A figura 22 exibe a comparação das médias entre os grupos experimentais referentes à densidade de células em divisão mitótica. A análise dos dados não mostrou diferença significativa entre os grupos H10 e HT10, nem entre os grupos H21 e HT21. No entanto, a comparação dos grupos H10 e HT10 com o grupo C10 evidenciou densidade significativamente maior nos animais controles. Semelhantemente ocorreu com o grupo hidrocefálico e hidrocefálico tratado com 21 dias de evolução da doença quando comparados com o grupo C21. Esses animais controles exibiram densidade celular na região da matriz germinativa significativamente maior que os demais grupos pertencentes ao seu tempo de evolução da hidrocefalia.

Figura 21. Fotomicrografias da matriz germinativa com imunomarcção para o Ki67 de ratos com 17 e 28 dias de vida (10 e 21 dias pós-injeção de caulim, respectivamente): (A) C10. (B) H10. (C) HT10. (D) C21. (E) H 21. (F) HT21. Objetiva de 40X (imersão). Barra: 20 µm

Proliferação celular - matriz germinativa

Figura 22. Gráfico representativo da densidade de células em divisão mitótica imunomarcadas pelo anticorpo Ki67 na região da matriz germinativa nos diferentes grupos experimentais.
* $p < 0.05$

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A proposta do presente trabalho foi avaliar a possível ação neuroprotetora dos polifenóis antioxidantes, especificamente da galato de epigallocatequina (EGCG), extraídos da *Camellia sinensis* (chá verde) em diferentes regiões e estruturas encefálicas de ratos com 7 dias de vida pós-natal submetidos à indução da hidrocefalia pela injeção intracisternal de caulim. Para tal intento, valemo-nos da observação de três parâmetros: evolução do ganho diário de peso dos animais, avaliação do comportamento dos animais em testes de campo aberto e labirinto em T, e análise histopatológica das áreas lesadas, tanto por histologia (avaliação da citoarquitetura geral e do grau de mielinização), quanto por imunistoquímica (avaliação da astrogliose e da proliferação celular).

Nosso resultado referente ao parâmetro ganho ponderal mostrou que, embora a comparação entre o grupo hidrocefálico e controle não tenha mostrado diferença significativa, houve tendência de menor ganho de peso para os animais hidrocefálicos, em particular nos primeiros dias após a indução da hidrocefalia. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho realizado por Lopes et al. (2009), ao analisar as variações do peso corporal no estudo da hidrocefalia induzida por caulim em camundongos jovens e jovens adultos. Essa diferença encontrada nos primeiros dias pós-indução deve-se, possivelmente, ao início do desenvolvimento da doença marcada por dilatação ventricular, aumento da pressão intracraniana e cefaléia. Além disso, o estresse provocado pela injeção de caulim pode produzir nos animais o comportamento de desmotivação na busca por alimento, caracterizado pela apatia (menor movimentação na caixa-alojamento) e o consequente isolamento social.

Curiosamente, a comparação entre os animais hidrocefálicos tratados e não tratados com o polifenol, mostrou menor ganho ponderal do grupo tratado, com diferença significativa do início ao fim do experimento. Este fato pode ser explicado pelo estresse adicional que esses animais foram submetidos ao receberem injeções diárias intraperitoneal de polifenol, correndo também o risco de terem alguma estrutura interna atingida por uma aplicação mal sucedida. Ademais, foi observado, quase que na maioria deles, uma espécie de reação inflamatória na região de aplicação da injeção, não sabendo ao certo o grau de comprometimento que essa

inflamação possa ter causado nos animais, se simplesmente a nível cutâneo ou, mais profundamente, a nível visceral, podendo comprometer a absorção dos nutrientes provenientes da alimentação.

Sabemos que todas essas complicações poderiam ser evitadas ou minimizadas mudando-se a via de administração do polifenol, todavia utilizamos a injeção intraperitoneal devido à dificuldade em administrá-lo por via oral (gavagem) em animais recém-nascidos. Entretanto, Etus et al. (2003) mesmo utilizando ratos adultos em seus estudos, optaram pela via intraperitoneal para administração da catequina EGCG, não relatando qualquer complicação decorrente das injeções.

Para análise dos parâmetros de comportamento motor e memória, utilizamos em nosso estudo o teste de campo aberto (*Open field*) e do labirinto em T. O estudo do desenvolvimento sensoriomotor e comportamento deambulatório realizado através do *Open field*, tiveram por finalidade avaliar a atividade motora e exploratória dos animais de modo semelhante aos estudos realizados por Lopes et al. (2009). Observamos no primeiro dia do teste (5º dia pós-indução da hidrocefalia) que todos os animais, sem exceção, apresentaram dificuldades para realizar a deambulação exibindo curvatura cifótica, marcha com base alargada instável e trêmula, devido à fraqueza, e falta de controle das patas traseiras. Esse comportamento é considerado normal para a idade uma vez que, o encéfalo do animal ainda não atingiu a sua plena maturação seguindo o desenvolvimento no sentido céfalo-caudal (GESELL, 2003).

Nossos resultados mostraram diferença significativa apenas no segundo dia do teste (P7) quando comparados os animais controles com os animais hidrocefálicos tratados com polifenol, tendo os animais não puncionados obtido a maior pontuação no escore. No entanto, ao longo da aplicação dos testes, observamos uma gradual evolução nos animais hidrocefálicos tratados, tendendo a permanecer muito próxima da média alcançada pelos animais controles no final do experimento. Acreditamos que a baixa pontuação obtida por esses animais apenas no segundo dia do teste e a evolução mais lenta no desenvolvimento sensoriomotor, possa ser explicada pela dilatação ventricular da fase aguda da hidrocefalia, seguida de seus sinais e sintomas limitantes. Ademais, é provável que as injeções diárias do polifenol tenham produzido um estresse adicional nesses animais. A apresentação de uma baixa atividade motora, grande preferência pela periferia da arena e alta

taxa de defecação, são sugestivas de um comportamento ansioso por parte desses ratos tratados. Em contrapartida, os demais grupos (controle e hidrocefálico) exibiram este comportamento semelhante apenas no primeiro teste, ambientando-se mais rapidamente. O resultado encontrado por nós no grupo de animais hidrocefálicos tratados foi semelhante ao encontrado por Salmaso et al. (2012), para comprovar a reversão dos déficits cognitivos através do enriquecimento ambiental em ratos submetidos à hipoxemia induzida. Os autores observaram que os resultados do teste de campo aberto mostraram um aumento da ansiedade nesse modelo de ratos, que não foi melhorado com o enriquecimento ambiental a curto prazo; sugerindo que o comportamento da ansiedade após lesão hipóxica é mediado por diferentes alterações neurobiológicas que não sensíveis neste tempo de enriquecimento.

Como parâmetro de avaliação do aprendizado e memória dos ratos utilizamos o teste do labirinto em T (*T-Maze*). Em nossos achados não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais em qualquer dos tempos de evolução da hidrocefalia que pudesse definir, de maneira consistente, a presença ou não de comprometimento da memória e aprendizado nos ratos hidrocefálicos, nem o possível papel neuroprotetor dos polifenóis do chá verde. Em concordância com os nossos resultados Meira (2010), também não obteve, com o teste do labirinto em T, resultados que pudessem comprovar o comprometimento da memória e aprendizado em ratos hidrocefálicos, nem a possível resposta positiva ao tratamento desses animais com o antiinflamatório cetoprofeno. Em contrapartida, em estudo para averiguar as alterações comportamentais decorrentes da lesão da substância branca periventricular em ratos com hidrocefalia crônica, Del Bigio et al. (2003), utilizando o teste modificado de Morris, obtiveram pontuação significativamente inferior para os ratos hidrocefálicos quando comparados aos seus controles. Portanto inferimos que o teste do labirinto em T pode não ter sido sensível o suficiente para demonstrar as diferenças cognitivas por nós investigadas entre os grupos experimentais.

Outro parâmetro utilizado em nosso estudo para verificar o efeito protetor dos polifenóis, foi a análise histopatológica dos encéfalos dos grupos experimentais e a comparação entre eles. A análise da citoarquitetura dos encéfalos corados com hematoxilina e eosina mostrou alterações morfológicas principalmente nas regiões do corpo caloso, cápsula externa, córtex cerebral dorsal e matriz germinativa.

Embora tenhamos percorrido todo o encéfalo em busca de lesões resultantes da hidrocefalia, encontramos especialmente nessas regiões acima citadas, provavelmente devido à proximidade delas das cavidades ventriculares, onde as forças de estiramento e compressão provenientes da dilatação ventricular exercem maior dano às estruturas adjacentes. Nos ratos com hidrocefalia, nossos estudos histopatológicos revelaram distorção do encéfalo e afilamento e destruição do corpo caloso, com ruptura ou desnudamento da camada endimária subventricular. Na cápsula externa observamos edema intersticial e esgarçamento do tecido. Já o córtex cerebral apresentou-se comprimido e levemente edemaciado, sem sinais de esgarçamento. Observamos que todas essas alterações estavam presentes em variados graus e relacionadas de forma diretamente proporcional ao tamanho ventricular, independente do tempo de evolução da doença. Em trabalho realizado com camundongos induzidos experimentalmente à hidrocefalia, Lopes et al. (2009) observaram em seus resultados histopatológicos que a destruição da camada endimária ocorreu apenas nas estruturas adjacentes à substância branca periventricular no cérebro dorsal, região onde a dilatação ventricular foi mais grave. Todavia, o afilamento do corpo caloso não estava relacionado com o grau de dilatação ventricular nos ratos com sete dias pós-indução da hidrocefalia.

A análise pelo método histoquímico da solocromo-cianina visa mensurar de forma indireta o grau de mielinização da substância branca periventricular através da tonalidade azul. Os nossos resultados mostraram um padrão progressivo na mielinização do corpo caloso dos ratos controles com 17 e 28 dias de vida. Segundo Elberger (1982), a mielinização dessa estrutura em ratos inicia-se por volta do 13º dia de vida pós-natal, aumentando consideravelmente no final do 1º mês e prosseguindo até ao 10º mês de idade. A maturação pós-natal e progressiva do corpo caloso de ratos pode ser justificada pela quantidade expressiva de células da neuróglia encontradas nessa estrutura em ratos jovens. Estudos mostraram aumento no número dessas células em animais com quatorze dias de vida demonstrando a função delas no processo de mielinização axonal. Com o decorrer do tempo e o progressivo aumento da quantidade de fibras mielinizadas, as células da neuróglia tendem a reduzir seu número, indicando terminalização desse processo (LOPES et al., 2003).

Em nossos resultados constatamos atraso da mielinização nos animais com hidrocefalia em ambas as idades, notado pela menor intensidade da coloração azul quando comparado aos seus respectivos controles. Houve nítida diferença visual na intensidade da cor azul entre os animais hidrocefálicos e os animais hidrocefálicos tratados com o polifenol. Em ambas as idades, 17 e 28 dias de vida (10 e 21 dias pós-indução da hidrocefalia, respectivamente), o corpo caloso estava mais fortemente corado em azul no grupo de ratos hidrocefálicos tratados com o polifenol, sugerindo melhor padrão de mielinização dessa região devido ao possível efeito neuroprotetor do polifenol administrado a esses animais. Este atraso era ainda mais grave quanto maior a dilatação ventricular. Resultados semelhantes foram obtidos por Correa (2010) ao estudar a eficácia do tratamento por derivação liquórica em ratos hidrocefálicos. Nesse estudo os animais hidrocefálicos apresentaram o corpo caloso corado em azul com menor intensidade quando comparados aos seus controles. Além disso, a comparação visual entre os animais hidrocefálicos e aqueles tratados com derivação liquórica funcionante, demonstraram maior intensidade da cor azul nos ratos operados, indicando que o tratamento com a técnica auxilia na recuperação do processo de mielinização.

Através da medida da espessura do corpo caloso buscamos obter de forma direta um parâmetro a respeito do grau de dilatação ventricular e indiretamente a sua associação com o nível de lesão tecidual. Observamos que os ratos com hidrocefalia que receberam tratamento com o polifenol exibiam corpo caloso mais espesso e preservado quando comparado aos ratos hidrocefálicos sem tratamento. No entanto, essa diferença foi significativa somente nos animais com 17 dias de vida (HT10 e H10), não sendo observada nos grupos com idade mais avançada. A explicação para este achado talvez esteja na tendência protetora do polifenol, especificamente no período agudo da doença, quando a dilatação ventricular está em seu início. É sabido que o seu possível efeito neuroprotetor não tem a capacidade de agir diretamente no impedimento ou diminuição da progressão da dilatação ventricular, mas sim nos mecanismos biomoleculares relacionados à cascata oxidativa, que por sua vez promove lesões no parênquima cerebral através da geração de radicais livres. Estudos com ratos geneticamente modificados para o desenvolvimento da hidrocefalia comprovaram a produção de metabólitos nocivos ao tecido cerebral especialmente na fase aguda da dilatação ventricular. Socci *et al.*

(1999), com o objetivo de avaliar a relação entre estresse oxidativo e a progressão da hidrocefalia, comprovaram que a geração de espécies reativas de oxigênio em modelos de ratos com hidrocefalia congênita (*H-Tx rat model*), alcançou níveis significantes no córtex cerebral, cerebelo e hipocampo entre os dias 4 e 10 de vida desses animais.

Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC. Embora durante muito tempo estas células tenham sido consideradas apenas como suporte estrutural para os neurônios, hoje têm seu papel reconhecido por sua capacidade dinâmica, participando não somente do desenvolvimento e da manutenção da fisiologia normal, mas também respondendo a injúrias (HE; SUN, 2007). Os astrócitos são ativados em situações de agressão ao SNC. Uma das características observadas durante a ativação glial é a expressão aumentada de GFAP em um processo chamado astrogliose reativa que ocorre em situações como trauma, desordens genéticas, insultos químicos e doenças neurodegenerativas (ENG et al., 2000).

Em nosso estudo, a análise histopatológica por imunistoquímica para o GFAP demonstrou que os astrócitos imunomarcados nas diferentes regiões estudadas dos ratos com hidrocefalia apresentavam-se intensamente corados e com prolongamentos grosseiros, diferentes dos animais hidrocefálicos tratados com o polifenol, que apresentavam astrócitos mais delicados com prolongamentos finos. Esse aspecto mais grosseiro dos astrócitos deve-se justamente ao fato dessas células estarem ativadas para realizarem a reparação e a cicatrização do SNC nos mais diferentes tipos de agressão. Nossos resultados mostraram menor densidade astrocitária no corpo caloso e na cápsula externa do grupo HT10 quando comparado com o grupo H10, demonstrando menor grau de agressão nessas estruturas encefálicas nos animais que receberam tratamento com o polifenol. Esses achados sugerem que o polifenol extraído da *Camellia sinensis* tenha exercido um papel neuroprotetor através das suas conhecidas propriedades antioxidantes, preservando o tecido de maiores danos causados pela liberação de espécies reativas de oxigênio. Etus et al. (2003) obtiveram resultados satisfatórios, do ponto de vista bioquímico, em trabalho realizado com a administração da catequina EGCG em ratos induzidos à hidrocefalia experimental com 3 semanas de idade. Os autores concluíram que a injeção intraperitoneal de EGCG (50mg/kg) diariamente por 15 dias reduziu significativamente os níveis de malondialdeído na substância branca

periventricular dos ratos tratados quando comparados com os ratos hidrocefálicos que não receberam tratamento.

Como descrito anteriormente, encontramos diferença significativa para a imunomarcção do GFAP apenas nos animais mais jovens, sacrificados com dez dias de evolução da doença. (17 dias de vida). A possível explicação para este achado estaria nas lesões subsequentes encontradas nos ratos com mais tempo de evolução da hidrocefalia. Nesses animais o contínuo aumento do gradiente de pressão entre os ventrículos e o parênquima cerebral facilitaria a dilatação ventricular potencializando a agressão tecidual. Em estudo com camundongos com indução da hidrocefalia em tempos diferentes foi observado, através de imagens de ressonância magnética, ventriculomegalia grave seguida de afilamento do corpo caloso e destruição da substância branca por 14 dias, em animais injetados com caulim no sétimo dia de idade (camundongos jovens). Em contrapartida, no grupo injetado com 7 – 8 semanas de idade (adultos jovens), foi observado dilatação ventricular moderada sem destruição aparente da substância branca (LOPES et al., 2009). De forma semelhante, nossos animais com 21 dias de evolução da doença (H21 e HT21) apresentaram grau de dilatação ventricular consideravelmente grave, resultando na destruição e perda da substância branca periventricular. Dessa forma, a astrogliose não se revelava significativa no registro da densidade de astrócitos imunomarcados, ou mesmo aparecia diminuída, pois esses astrócitos reativos também haviam sido destruídos. Podemos ainda inferir que, a atuação do polifenol foi eficaz apenas nos primeiros dias de evolução da doença. As catequinas não têm a capacidade de agir em bases estruturais para impedir ou retardar a dilatação ventricular, mas atua especificamente nos mecanismos bioquímicos e moleculares tentando amenizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Sendo assim, a ação antioxidante do polifenol seria ineficiente para atenuar os efeitos deletérios resultantes da ventriculomegalia progressiva.

Através do método imunoistoquímico para o anticorpo Ki67 contabilizamos as células em divisão mitótica imunomarcadas na região da matriz germinativa, localizada no ângulo externo dos ventrículos laterais do cérebro (região de intensa proliferação celular). Essa região constitui-se no pólo migrador das células que irão constituir o córtex cerebral. O desenvolvimento do córtex cerebral humano consiste basicamente de três estágios: 1) proliferação das células precursoras e sua

diferenciação, formando neuroblastos ou células da glia; 2) migração neuronal a partir da matriz germinativa, localizada na região periventricular, em direção ao córtex em desenvolvimento; e 3) organização cortical em seis camadas, associada à sinaptogênese e à apoptose. A matriz germinativa representa o remanescente da zona germinativa, estrutura proveniente do neuroepitélio germinativo constituinte do tubo neural primitivo. Entre 10-24 semanas de gestação humana, esta região celular é a fonte de precursores neuronais. Após 24 semanas de gestação, a migração neuronal se completou, mas a matriz germinativa provê precursores gliais que se tornarão oligodendrócitos e astrócitos. Neste estágio tardio da gliogênese, os astrócitos migram às camadas superiores corticais e são cruciais para a sobrevivência neuronal e o desenvolvimento normal do córtex cerebral (VASILEIADIS et al., 2004). Diferentemente dos humanos, em ratos, a maturação do SNC ocorre nos dias subseqüentes ao nascimento sendo, assim, pós-natal. Portanto, o desenvolvimento normal desses animais é caracterizado por intensa celularidade nessa região quanto mais jovem for o rato. Com o decorrer da migração neuronal, a celularidade pronunciada na matriz germinativa diminui gradualmente, até desaparecer (Ol et al., 1996).

Em conformidade com a maturação normal do SNC, observamos em nosso trabalho que os animais controles (C10 e C21) apresentaram intensa celularidade na região da matriz germinativa. No entanto, os animais hidrocefálicos e os hidrocefálicos tratados apresentaram imunomarcacão discreta em relação aos seus controles. Isso pode ser explicado pela adjacência dessas células aos ventrículos laterais do cérebro, tornando-as bastante vulneráveis aos agravos oriundos da dilatação dessas cavidades. Por isso, em nossos estudos, observamos uma relação inversamente proporcional entre o grau de dilatação ventricular e a celularidade na região da matriz germinativa. Resultados semelhantes foram descritos por Lopes et al. (2009) em estudo com camundongos induzidos à hidrocefalia com injeção intracisternal de caulim. Nos animais controles com 14 dias de vida foi encontrada grande proliferação celular na zona subependimária do córtex, ao contrário dos animais hidrocefálicos com a mesma idade, que apresentaram uma celularidade extremamente baixa para a imunomarcacão com o anticorpo Ki67.

A comparação entre os grupos de animais hidrocefálicos e hidrocefálicos tratados com o polifenol, não apresentou diferença significativa. A explicação para

esse resultado deve-se, possivelmente, aos mecanismos de atuação das catequinas encontradas no polifenol. Como já descrevemos, as catequinas são potentes antioxidantes *scavengers* de radicais livres, quelantes de metais e inibidores da lipoperoxidação. Seu papel neuroprotetor é atuar especificamente sobre os desarranjos bioquímicos e moleculares advindos da liberação de espécies reativas de oxigênio. Portanto, a progressiva dilatação ventricular não pode ser impedida ou minimizada por sua ação.

O tratamento capaz de agir nas bases estruturais da dilatação ventricular e tentar o impedimento e a redução da sua evolução são as derivações cirúrgicas. No entanto, sabe-se que existem grandes dificuldades em se estabelecer o momento exato desta intervenção devido à possibilidade de estabilização espontânea da dilatação ventricular ou risco cirúrgico devido a problemas clínicos graves (infecções, cardiopatias, déficits imunológicos severos, etc.). Durante este período de indecisão, a espera pode acarretar sérias lesões ao cérebro em consequência da isquemia, da peroxidação lipídica e da crescente formação de radicais livres. As catequinas com o seu papel neuroprotetor podem atuar como adjuvantes nesse tratamento, minimizando, ou até mesmo, prevenindo as lesões resultantes do acúmulo e atuação de metabólitos nocivos ao parênquima cerebral.

No presente estudo observamos esse efeito neuroprotetor em resultados obtidos na atividade astrogliar através da imunomarcagem por GFAP e, na medida da espessura do corpo caloso e avaliação do grau de mielinização através da coloração solocromo-cianina. Estes resultados benéficos foram encontrados na comparação entre os grupos H10 e HT10 (animais com 17 dias de vida). Portanto, como as respostas positivas foram parciais, limitadas apenas a alguns dos parâmetros estudados, propomos pesquisas adicionais que possam explorar, junto com a terapêutica neuroprotetora, técnicas de derivação cirúrgica e análises bioquímicas e biomoleculares do tecido cerebral. O acréscimo dessas medidas em estudos posteriores poderá revelar uma terapêutica adjuvante eficiente e segura para o aprofundamento com testes clínicos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Analizados os resultados e suas inter-correlações concluímos que:

1. A avaliação do peso corporal diário pode ser considerada como um bom indicativo da progressão da hidrocefalia; demonstrando uma relação inversamente proporcional entre o ganho ponderal e o grau de dilatação ventricular.
2. Não foram identificadas diferenças significantes nas avaliações comportamentais.
3. A avaliação histológica por solocromo-cianina comprova o papel prejudicial que a hidrocefalia exerce sobre a mielinização das estruturas periventriculares e o tratamento com o polifenol possivelmente auxilia na recuperação do processo de mielinização.
4. A dilatação ventricular progressiva na hidrocefalia contribui para o desaparecimento das células migratórias na região da matriz germinativa evidenciada pela imunomarcacão do Ki67.
5. O polifenol administrado por 9 dias consecutivos a partir da indução da hidrocefalia, reduziu a atividade astrocitária evidenciada pela imunomarcacão do GFAP no corpo caloso, cápsula externa e matriz germinativa.
6. Nos animais que receberam injeções de polifenol por 9 dias consecutivos, houve melhor preservação da espessura do corpo caloso; inferindo um possível efeito neuroprotetor na fase inicial de instalação da doença.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANDEWEG, J. Intracranial venous pressures, hydrocephalus and effects of cerebrospinal fluid shunts. **Childs Nerv Syst**, v. 5, n. 5, p. 318-23, Oct 1989.

ANGHILERI, L. J.; THOUVENOT, P. Natural polyphenols-iron interaction: its biological importance. **Biol Trace Elem Res**, v. 73, n. 3, p. 251-8, Mar 2000.

BERGOLD, A. M. et al. **Processo de obtenção de extrato de chá vegetal compreendendo catequinas e composições compreendendo o mesmo**. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ, U. F. D. R. G. D. S. Brasil. PI0801447-7 A2: 1-20 p. 2009.

BONDURANT, C. P.; JIMENEZ, D. F. Epidemiology of cerebrospinal fluid shunting. **Pediatr Neurosurg**, v. 23, n. 5, p. 254-8; discussion 259, 1995.

BRAUN, K. P. et al. In vivo ¹H MR spectroscopic imaging and diffusion weighted MRI in experimental hydrocephalus. **Magn Reson Med**, v. 40, n. 6, p. 832-9, Dec 1998.

CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. Beneficial effects of green tea--a review. **J Am Coll Nutr**, v. 25, n. 2, p. 79-99, Apr 2006.

CANER, H. et al. Lipid peroxide level increase in experimental hydrocephalus. **Acta Neurochir (Wien)**, v. 121, n. 1-2, p. 68-71, 1993.

CASTRO-GAGO, M. et al. Therapeutic criteria in hydrocephalic children. **Childs Nerv Syst**, v. 5, n. 6, p. 361-3, Dec 1989.

CHACKO, S. M. et al. Beneficial effects of green tea: a literature review. **Chin Med**, v. 5, p. 13, 2010.

CHEN, L. et al. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. **Drug Metab Dispos**, v. 25, n. 9, p. 1045-50, Sep 1997.

COCHRANE, D. et al. Model for the cost analysis of shunted hydrocephalic children. **Pediatr Neurosurg**, v. 23, n. 1, p. 14-9, 1995.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids--Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

CORREA, D. A. L. **Avaliação do tratamento por derivação líquórica da hidrocefalia experimental induzida em ratos**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.

COTELLE, N. Role of flavonoids in oxidative stress. **Curr Top Med Chem**, v. 1, n. 6, p. 569-90, Dec 2001.

DEFEO, D. R. et al. Histological examination of kaolin-induced hydrocephalus. Its implications in the therapy of animals with experimentally induced hydrocephalus. **J Neurosurg**, v. 50, n. 1, p. 70-4, Jan 1979.

DEL BIGIO, M. R.; BRUNI, J. E.; FEWER, H. D. Human neonatal hydrocephalus. An electron microscopic study of the periventricular tissue. **J Neurosurg**, v. 63, n. 1, p. 56-63, Jul 1985.

DEL BIGIO, M. R.; MCALLISTER II, J. P. Hydrocephalus - Pathology. In: CHOUX, M.; DI ROCCO, C., et al (Ed.). **Pediatric Neurosurgery**. 1. Londres: Churchill Livingstone, 1999. cap. 10, p.217-236.

DEL BIGIO, M. R.; WANG, X.; WILSON, M. J. Sodium channel-blocking agents are not of benefit to rats with kaolin-induced hydrocephalus. **Neurosurgery**, v. 51, n. 2, p. 460-6; discussion 466-7, Aug 2002.

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.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 16, p. 4912-6, Aug 2000.

DUARTE, M. R.; MENARIM, D. O. Leaf and stem anatomical morpho-diagnosis of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 4, p. 545-551, 2006.

EDWARDS, M. S. et al. Kaolin-induced congenital hydrocephalus in utero in fetal lambs and rhesus monkeys. **J Neurosurg**, v. 60, n. 1, p. 115-22, Jan 1984.

ELBERGER, A. J. The functional role of the corpus callosum in the developing visual system: a review. **Prog Neurobiol**, v. 18, n. 1, p. 15-79, 1982.

ENG, L. F.; GHIRNIKAR, R. S.; LEE, Y. L. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem Res**, v. 25, n. 9-10, p. 1439-51, Oct 2000.

ETUS, V. et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate prevents oxidative damage on periventricular white matter of infantile rats with hydrocephalus. **Tohoku J Exp Med**, v. 200, n. 4, p. 203-9, Aug 2003.

FERSTEN, E. et al. Cerebrospinal fluid free-radical peroxidation products and cognitive functioning patterns differentiate varieties of normal pressure hydrocephalus. **Folia Neuropathol**, v. 42, n. 3, p. 133-40, 2004.

FREITAS, G. R. et al. [Neuroprotective agents in stroke: national opinion]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 63, n. 3B, p. 889-91, Sep 2005.

- GESELL, A. **A criança de 0 a 5 anos**. São Paulo: Martins Fontes, 2003.
- GRAHAM, H. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Prev Med**, v. 21, n. 3, p. 334-50, May 1992.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford, p. 96-98, 1989.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford, 2007.
- HE, F.; SUN, Y. E. Glial cells more than support cells? **Int J Biochem Cell Biol**, v. 39, n. 4, p. 661-5, 2007.
- HOCHWALD, G. M. Animal models of hydrocephalus: recent developments. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 178, n. 1, p. 1-11, Jan 1985.
- HOMANICS, G. E. et al. Exencephaly and hydrocephaly in mice with targeted modification of the apolipoprotein B (Apob) gene. **Teratology**, v. 51, n. 1, p. 1-10, Jan 1995.
- HOMANICS, G. E. et al. Targeted modification of the apolipoprotein B gene results in hypobetalipoproteinemia and developmental abnormalities in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 6, p. 2389-93, Mar 1993.
- JANSEN, J. Etiology and prognosis in hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 4, n. 5, p. 263-7, Oct 1988.
- JONES, H. C. et al. Progressive tissue injury in infantile hydrocephalus and prevention/reversal with shunt treatment. **Neurol Res**, v. 22, n. 1, p. 89-96, Jan 2000.
- KHAN, O. H.; ENNO, T. L.; DEL BIGIO, M. R. Brain damage in neonatal rats following kaolin induction of hydrocephalus. **Exp Neurol**, v. 200, n. 2, p. 311-20, Aug 2006.
- KIEFER, M. et al. The ependyma in chronic hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 14, n. 6, p. 263-70, Jun 1998.
- LEE, M. J. et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 11, n. 10 Pt 1, p. 1025-32, Oct 2002.
- LEE, K. et al. Congenital hydrocephalus and abnormal subcommissural organ development in Sox3 transgenic mice. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e29041, 2012.
- LENNON, S. V.; MARTIN, S. J.; COTTER, T. G. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. **Cell Prolif**, v. 24, n. 2, p. 203-14, Mar 1991.

LOPES, L.; MACHADO, H.; LACHAT, J. Study of callosum in experimental hydrocephalic Wistar rats. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 5, p. 10-13, 2003.

LOPES, L. A. S.; SLOBODIAN, I.; DEL BIGIO, M. R. Characterization of juvenile and young adult mice following induction of hydrocephalus with kaolin. **Exp Neurol**, v. 219, n. 1, p. 187-96, Sep 2009.

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

MANDEL, S. A. et al. Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. **Neurosignals**, v. 14, n. 1-2, p. 46-60, 2005.

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **J Cell Physiol**, v. 192, n. 1, p. 1-15, Jul 2002.

MCLONE, D. G. Consensus: modelling of hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 10, n. 1, p. 24-8, Jan 1994.

MEIRA, K. V. **Hidrocefalia experimental e neuroproteção: Efeitos do cetoprofeno na hidrocefalia induzida pelo caulim em ratos lactentes**. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

MILHORAT, T. H. **Pediatric Neurosurgery**. 2. Philadelphia: F. A. Davis Co, 1979.

MORI, K. et al. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in congenital hydrocephalic rat brain. **Childs Nerv Syst**, v. 9, n. 3, p. 136-41, Jun 1993.

NUSS, J. I. et al. Copper and free radical accumulation in liver of calves with inherited hydrocephalus. **Am J Vet Res**, v. 28, n. 127, p. 1909-13, Nov 1967.

OI, S. et al. Experimental models of congenital hydrocephalus and comparable clinical problems in the fetal and neonatal periods. **Childs Nerv Syst**, v. 12, n. 6, p. 292-302, Jun 1996.

PETERSON, J.; DWYER, J. Taxonomic classification helps identify flavonoid-containing foods on a semiquantitative food frequency questionnaire. **J Am Diet Assoc**, v. 98, n. 6, p. 677-82, 685; quiz 683-4, Jun 1998.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod**, v. 63, n. 7, p. 1035-42, Jul 2000.

PORTNOY, H. D.; BRANCH, C.; CASTRO, M. E. The relationship of intracranial venous pressure to hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, v. 10, n. 1, p. 29-35, Jan 1994.

- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic Biol Med**, v. 20, n. 7, p. 933-56, 1996.
- SALGADO, J. M. **Guia dos funcionais: quando a alimentação é o melhor remédio**. São Paulo: Ediouro, 2009.
- SALMASO, N. et al. Environmental enrichment increases the GFAP+ stem cell pool and reverses hypoxia-induced cognitive deficits in juvenile mice. **J Neurosci**, v. 32, n. 26, p. 8930-9, Jun 2012.
- SATO, O.; OI, S.; YAMADA, S. **Hydrocephalus - experimental considerations and clinical analyses**. 1. Londres: Churchill Livingstone, 1999. 237-252.
- SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 11, p. 1191-212, Jun 2001.
- SCHMIDT, H. et al. Concentration of purine compounds in the cerebrospinal fluid of infants suffering from sepsis, convulsions and hydrocephalus. **J Perinat Med**, v. 23, n. 3, p. 167-74, 1995.
- SENGER, A. E. V.; SCHAWANKE, C. H. A.; GOTTLIEB, M. G. V. Green tea (*Camellia sinensis*) and its functionals properties on transmissible chronic diseases. **Sci. Med.**, v. 20, n. 4, p. 292-300, 2010.
- SHAW, C. A. **Glutathione in the nervous system**. Washington: Taylor and Francis, 1998.
- SHOESMITH, C. L.; BUIST, R.; DEL BIGIO, M. R. Magnetic resonance imaging study of extracellular fluid tracer movement in brains of immature rats with hydrocephalus. **Neurol Res**, v. 22, n. 1, p. 111-6, Jan 2000.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v. 82, n. 2, p. 291-5, Mar 1997.
- SIMON, T. D. et al. Hospital care for children with hydrocephalus in the United States: utilization, charges, comorbidities, and deaths. **J Neurosurg Pediatr**, v. 1, n. 2, p. 131-7, Feb 2008.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 1102.
- SKRZYDLEWSKA, E. et al. Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 232-8, Apr 2002.
- SOCCI, D. J. et al. Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. **Exp Neurol**, v. 155, n. 1, p. 109-17, Jan 1999.

- SOL, J.; HAGENDIJK, J. J. [Copper deficiency in newborn lambs]. **Tijdschr Diergeneeskd**, v. 120, n. 3, p. 78-80, Feb 1995.
- THOMAS, B. H.; CHENG, D. W. Congenital abnormalities associated with vitamin E malnutrition. **Iowa Academy of Science**, v. 59, p. 218-225, 1952.
- TIRAPELLI, D. P. et al. Ultrastructural study of the lateral ventricle choroid plexus in experimental hydrocephalus in Wistar rats. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 65, n. 4A, p. 974-7, Dec 2007.
- TREVISANATO, S. I.; KIM, Y. I. Tea and health. **Nutr Rev**, v. 58, n. 1, p. 1-10, Jan 2000.
- VASILEIADIS, G. T. et al. Uncomplicated intraventricular hemorrhage is followed by reduced cortical volume at near-term age. **Pediatrics**, v. 114, n. 3, p. e367-72, Sep 2004.
- VOGEL, P. et al. Congenital hydrocephalus in genetically engineered mice. **Vet Pathol**, v. 49, n. 1, p. 166-81, Jan 2012.
- WARDEN, B. A. et al. Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. **J Nutr**, v. 131, n. 6, p. 1731-7, Jun 2001.
- YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea. **J Agric Food Chem**, v. 51, n. 25, p. 7396-401, Dec 2003.
- ZAGER, E. L.; AMES, A. Reduction of cellular energy requirements. Screening for agents that may protect against CNS ischemia. **J Neurosurg**, v. 69, n. 4, p. 568-79, Oct 1988.
- ZHU, M.; CHEN, Y.; LI, R. C. Oral absorption and bioavailability of tea catechins. **Planta Med**, v. 66, n. 5, p. 444-7, Jun 2000.

**As referências foram formatadas de acordo com as normas da ABNT (Sistema Autor-Data) segundo o modelo de diretrizes para a apresentação de dissertações e teses da USP (2ª edição – Revisada e ampliada, 2009)*