UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA

Ricardo Andrade Brandão

O sistema renina-angiotensina como potencial alvo terapêutico na hidrocefalia experimental. Estudo comportamental, histológico e imunoistoquímico

Ribeirão Preto - SP
2018

RICARDO ANDRADE BRANDÃO

O sistema renina-angiotensina como potencial alvo terapêutico na hidrocefalia experimental. Estudo comportamental, histológico e imunoistoquímico

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. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Área de concentração: Morfologia e Medicina Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes.

Ribeirão Preto

2018

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.

Catalogação da publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Brandão, R. A.

O sistema renina-angiotensina como potencial alvo terapêutico na hidrocefalia experimental. Estudo comportamental, histológico e imunoistoquímico/ Ricardo Andrade Brandão; orientadora Dra. Luiza da Silva Lopes. – Ribeirão Preto, 2018.
86 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

1. Hidrocefalia. 2. Captopril. 3. Losartana potássica 4. Sistema renin-angiotensina.

BRANDÃO, R. A. O sistema renina-angiotensina como potencial alvo terapêutico na hidrocefalia experimental. Estudo comportamental, histológico e imunoistoquímico. 86f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, que amo profundamente, admiro e são fontes de inspiração. Aos meus irmãos, que sempre me apoiaram e são minhas mais honestas amizades. À Gabriela, por ser a melhor companhia nos momentos difíceis e pelo apoio incondicional. E a toda a minha família e amigos, sem o apoio eu não teria a confiança necessária para correr atrás dos meus sonhos.

Agradecimentos

À minha orientadora Dra. Luiza da Silva Lopes por todo o conhecimento transmitido e por nunca economizar esforços para o ensino da pesquisa, serei eternamente grato.

Ao professor Dr. Hélio Rubens Machado que contribuiu de forma fundamental para a elaboração deste trabalho.

Ao Departamento de Cirurgia e Anatomia pela infraestrutura disponibilizada.

Aos técnicos do laboratório de histologia, Jorge e Sandra, pessoas que levarei para o resto da vida em meus pensamentos.

Aos técnicos da cirurgia experimental por toda a ajuda e suporte dispendido para a realização da pesquisa.

A todos os colegas de laboratório e companheiros do dia a dia que estiveram ao meu lado fazendo de cada dia um momento de muitas experiências boas. São eles: Ivair, Tetê, Rebeca, Pamela, Karine, Evelise, Thaís, Rafael, Hilton, Gérson, Paola, Matheus, Gustavo, e todos os demais que não citei aqui, mas são igualmente importantes!

Aos moradores da casa 110 por todos os momentos vividos e por fazerem da moradia um lar.

À todas as demais pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa.

*Não deveríamos estar buscando heróis,
deveríamos estar buscando boas ideias.*

Noam Chomsky

Resumo

BRANDÃO, R. A. **O sistema renina-angiotensina como potencial alvo terapêutico na hidrocefalia experimental. Estudo comportamental, histológico e imunoistoquímico.** 86f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introdução: as alterações fisiológicas e estruturais causadas pela hidrocefalia podem reduzir o fluxo sanguíneo cerebral e aumentar a atividade glial como consequência dos efeitos nocivos da isquemia e têm sido amplamente associadas a deficiência no desenvolvimento motor e a problemas cognitivos. **Objetivos:** avaliamos pela primeira vez os efeitos de captopril e da losartana potássica na hidrocefalia experimental e mensuramos possíveis efeitos neuroprotetores através de análise comportamental, histológica e imunoistoquímica. **Materiais e métodos:** ratos Wistar de 7 dias de vida (n=40) foram selecionados para compor os grupos controle (n=10); hidrocefálicos tratados com salina (n=10); hidrocefálicos tratado com captopril (n=10) e hidrocefálicos tratados com losartana potássica (n=10). Os dados foram colhidos através de testes comportamentais (teste de campo aberto, labirinto aquático de *Morris* e avaliação da atividade espontânea), histoquímica (coloração por hematoxilina-eosina e solocromo-cianina) e testes imunoistoquímicos (imunomarcção para GFAP e para Caspase-3) a fim de mensurar os efeitos de drogas. **Resultados:** os animais hidrocefálicos tratados com captopril apresentaram maior ganho de peso comparado aos outros animais hidrocefálicos, maior desempenho em atividades motoras espontâneas e melhor desempenho no labirinto aquático de *Morris*, enquanto os animais hidrocefálicos tratados com losartana potássica apresentaram melhores resultados na avaliação morfológica, reduzindo a densidade de astrócitos reativos na substância branca periventricular. **Conclusão:** o sistema renina-angiotensina apresentou um grande potencial de ação farmacológica para reduzir o dano neurológico na hidrocefalia experimental e possui grandes possibilidades de se tornar uma via de tratamento adjuvante para hidrocefalia.

Palavras chave: Hidrocefalia. Captopril. Losartana potássica. Sistema renina-angiotensina

Abstract

BRANDÃO, R. A. **The renin-angiotensin system as a potential therapeutic target in experimental hydrocephalus. Behavioral, histological and immunohistochemical study.** 86f. Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Introduction: physiological and structural changes induced by hydrocephalus can reduce cerebral blood flow and increase glial activity as a consequence of the harmful effects of ischemia and have been extensively associated with motor developmental impairment and cognitive problems. **Aim:** we evaluated for the first time the effects of captopril and losartan in experimental hydrocephalus and measured possible neuroprotective effects through behavioral, histological and immunohistochemical analysis. **Methods:** Wistar rats of 7 days of life (n = 40) were selected to compose the control groups (n = 10); hydrocephalic treated with saline (n = 10); hydrocephalic treated with captopril (n = 10) and hydrocephalic treated with losartan (n = 10). The data were collected through behavioral tests (open field test, Morris aquatic labyrinth, and evaluation of spontaneous activity), histochemistry (hematoxylin-eosin staining and solochrome-cyanine) and immunohistochemical tests (immunostaining for GFAP and Caspase-3) in order to measure the effects of drugs. **Results:** hydrocephalic animals treated with captopril presented greater weight gain compared to other hydrocephalic animals, higher performance in spontaneous motor activities and better performance in the Morris water labyrinth, while hydrocephalic animals treated with losartan potassium showed better results in the morphological evaluation, reducing the density of reactive astrocytes in the periventricular white matter. **Conclusion:** the renin-angiotensin system presented a great potential for pharmacological action to reduce neurological damage in experimental hydrocephalus and has great possibilities of becoming an adjuvant treatment route for hydrocephalus.

Keywords: Hydrocephalus. Captopril. Losartan. Renin-angiotensin system.

Lista de figuras

Figura 1: Ilustração da dinâmica liquórica	21
Figura 2 Fluxograma representando a cascata metabólica do SRA.....	27
Figura 3: Indução de hidrocefalia em rato wistar com 7 dias de vida.	40
Figura 4: Agulha de gavagem utilizada para aplicação dos medicamentos.	41
Figura 5: Arena do teste de campo aberto	42
Figura 6: Labirinto aquático de morris adaptado	44
Figura 7: Monitor de Atividades EP 149 – Insight, Ltda.....	46
Figura 8: Animal submetido à indução de hidrocefalia	51
Figura 10 Gráficos demonstrativos dos resultados obtidos na avaliação do desenvolvimento sensorio motor através do Teste de campo aberto.	54
Figura 11 Gráficos demonstrativos dos resultados obtidos na avaliação da memória espacial através do Labirinto aquático de Morris.	56
Figura 12 Gráfico representativo dos resultados obtidos na avaliação da atividade espontânea através do monitor de atividade.....	57
Figura 13 Fotomicrografias do encéfalo (região do corpo caloso e matriz germinativa) de ratos Wistar com coloração histológica por Hematoxilina-Eosina.	59
Figura 14 Fotomicrografias dos encéfalos (região do corpo caloso) de ratos com coloração histológica por Solocromo -Cianina	60
Figura 15 Gráfico demonstrativo da avaliação da espessura (média) do corpo caloso.	61
Figura 16 Fotomicrografia do encéfalo (região do corpo caloso) de ratos Wistar após imunoistoquímica para GFAP.....	62
Figura 17 Fotomicrografia da região do corpo caloso, córtex profundo e córtex superficial após imunoistoquímica para Caspase-3.	64

Lista de siglas e abreviações

AMPc – Adenosina monofosfato c

AngI – Angiotensina I

AngII - Angiotensina II

APA - Aminopeptidase A

BK – Bradicinina

BRA – Bloqueador dos receptores de angiotensina

BSA – Albumina bovina

DAB - diaminobenzidina

DAG – Diacilglicerol

DVA – Derivação ventriculoatrial,

DVP – Derivação ventriculoperitoneal

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

ECA 2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

GFAP – Proteína glial fibrilar ácida (*glial fibrillary acidic protein*)

Grupo C – Grupo controle

HRP – Estreptavidina (*Horseradish Peroxidase*)

HTC – Grupo hidrocefálico tratado com Captopril

HTLi – Grupo hidrocefálico tratado com Lisinopril

HTLo – Grupo hidrocefálico tratado com Losartana Potássica

HTS – Grupo hidrocefalia tratado com salina

ICAM-1 – Molécula de adesão inter-celular 1

iECA – Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina

IL-1B – Interleucina-1Beta

IP3 – Fosfatidilinositol trifosfato

IRAP - Membrana regulada por insulina

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LPS – Lipopolissacarídeos bacterianos

NEP - Endopeptidase neutra

NF-kB – Fator nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

PBS – Salina tamponada fosfatada

PC – Plexo coroide

PIC – Pressão intracraniana

rAT₁ – Receptor de angiotensina

rAT₂ – Receptor de angiotensina

SRA – Sistema Renina Angiotensina

SV – Sistema ventricular

SNC – Sistema nervoso central

TVE – Terceira ventriculostomia endoscópica

TNF- α – Fator de necrose tumoral

Sumário

1. Introdução	16
2. Fundamentação teórica	20
2.1. Hidrocefalia.....	20
2.1.1. Hidrocefalia experimental.....	24
2.2. Sistema renina-angiotensina	25
2.2.1 Sistema renina-angiotensina no SNC	28
2.3. Os iECAs e os BRAs	29
3. Justificativa	34
4. Objetivos	36
4.1. Objetivos específicos.....	36
5. Materiais e métodos.....	38
5.1. Formação dos grupos.....	38
5.2. Indução da hidrocefalia.....	39
5.3. Administração dos fármacos.....	40
5.4. Estudos comportamentais	41
5.4.1. Abertura ocular.....	41
5.4.2. Avaliação do peso corporal	41
5.4.3. Teste de campo aberto (<i>open field</i>)	42
5.4.4. Labirinto aquático de <i>Morris</i>	43
5.4.5. Comportamento motor espontâneo.....	44
5.5. Coleta das amostras de tecido cerebral	46
5.6. Histoquímica e imunoistoquímica	47
5.7. Documentação fotográfica	48
5.8. Análise estatística.....	49
6.0. Resultados	51
6.1. Avaliação do peso corporal.....	51

6.2. Avaliações comportamentais	53
6.2.1. Teste de campo aberto	53
6.2.2. Labirinto aquático de Morris	55
6.2.3. Monitor de atividade espontânea	56
6.3. Avaliações histológicas.....	58
6.3.1. Coloração por hematoxilina-eosina.....	58
6.3.2. Coloração por Solocromo Cianina	60
6.4. Avaliação por imunoistoquímica	61
6.4.1. GFAP	61
6.4.2. Capase 3.....	63
7. Discussão	66
8. Conclusão.....	74
9. Referências.....	76

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A redução do fluxo sanguíneo cerebral pode ocasionar danos irreversíveis ao encéfalo, especialmente no período inicial de vida em que a substância branca periventricular está em desenvolvimento e seu comprometimento pode implicar distúrbios neurológicos crônicos. Lesões nestas áreas têm sido associadas a déficits no desenvolvimento motor e a problemas cognitivos (Skoff et al., 2007).

A hidrocefalia é uma síndrome neurológica complexa causada pelo desequilíbrio entre a produção e a absorção do líquido cefalorraquidiano (LCR), ou líquor, chegando a afetar até 4 indivíduos a cada 1000 nascidos vivos, especialmente na infância, e pode comprometer o fornecimento de sangue ao cérebro em consequência da compressão e estiramento do tecido cerebral, ocasionado principalmente pela ventriculomegalia resultante do acúmulo de LCR no interior dos ventrículos cerebrais (Kahle et. al., 2016; Simon et.al., 2008). Os distúrbios neurológicos incluem a compressão de pequenos vasos sanguíneos na substância branca periventricular, levando a isquemia e hipóxia, e alterações reativas secundárias, como ativação e proliferação de astrócitos, alongamento e eventual destruição de axônios e perda de conexões entre neurônios, comprometendo a integridade, conectividade e funcionalidade (Del Bigio, 2010).

O método de tratamento mais comum consiste em procedimento cirúrgico, seja por implantação de uma válvula de derivação liquórica ou abertura alternativa ao fluxo de LCR (Kahle et. al., 2016; Simon et.al., 2008; Del Bigio, 2010). No entanto, é sabido que esses métodos nem sempre são efetivos o suficiente para conter todos os danos neurológicos, além de outras condições que influenciam a manutenção do tratamento, gerando alto custo para o sistema público de saúde (McAllister & Chovan, 1998; Dakurah et. al., 2016). Desde 1913 até o presente momento, técnicas de hidrocefalia experimental vem sendo utilizadas para esclarecer as lesões ocasionadas por esta síndrome (Dandy, 1919; Khan, Enno & Del Bigio, 2006; Lopes, Slobodian & Del Bigio, 2009) e propor terapias adjuvantes a fim de reduzir os danos neurológicos (Catalão et. al., 2014; Del Bigio & Di Curzio, 2016; Garcia et. al., 2017; Catalão et. al., 2017).

O sistema renina-angiotensina (SRA) está envolvido em funções vitais do corpo, tais como controle do tônus vascular, manutenção de sódio e retenção de líquido (Dzau & Pratt, 1986). A renina é uma enzima produzida principalmente pelos

rins, porém, também produzida em outros locais do corpo, incluindo o cérebro, e atua sobre o angiotensinogênio catalisando a formação da angiotensina I (angI) (Ganten & Speck, 1978). A angI ao entrar em contato com a enzima conversora de angiotensina (ECA) é transformada em angiotensina II (angII), o principal peptídeo ativo deste sistema. As ações da AngII ocorrem através da ligação do peptídeo aos seus receptores específicos. Os receptores mais amplamente estudados são os receptores AT1 (rAT1) e AT2 (rAT2) que têm funções opostas, enquanto os receptores AT1 são responsáveis pela vasoconstrição, os receptores AT2 estimulam a vasodilatação (Leeb-Lundberg et. al., 2005).

Duas principais classes de fármacos que atuam neste sistema são os inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) (Herman, 1992) e os bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA) (Michel et. al., 2013). A principal forma de ação dos iECA consiste no impedimento da conversão da angI em angII pela ECA, enquanto os BRA atuam bloqueando o sítio de ligação da AngII nos rAT₁, deixando livre a ligação nos rAT₂ (Ito et. al., 2002; Savoia & Schiffrin, 2007). Todos os componentes do SRA foram identificados no cérebro e têm sido amplamente estudados para identificar a participação deste sistema em diversas doenças neurológicas e suas possibilidades terapêuticas (Dzau & Pratt, 1986; Wright & Harding, 2011).

Um grande número de estudos tem indicado que o SRA local no cérebro pode estar envolvido na patogênese da isquemia cerebral, além de possuir importante potencial terapêutico para atuar na manutenção da vasculatura e influenciar a recuperação e controle da patogênese da isquemia cerebral (Ito et. al., 2002; Wright & Harding, 2011; Lou et. al., 2004). Estudos usando drogas que atuam no SRA mostraram resultados notáveis em condições desfavoráveis que afetam o sistema nervoso, tanto para iECA quanto para BRA (Werner et. al., 1991; Smeda & Daneshtalab, 2011; Saavedra, Sánchez-Lemus & Benicky, 2011).

Sabe-se que as alterações fisiológicas e estruturais causadas pela hidrocefalia reduzem o fluxo sanguíneo cerebral e aumentam a atividade glial como consequência dos efeitos nocivos da isquemia. Para avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores do sistema renina-angiotensina na hidrocefalia induzida por caulim, utilizamos o captopril (iECA) e a losartana potássica (BRA) para avaliar a sua influência nas respostas comportamentais e teciduais em um modelo de hidrocefalia induzido por caulim em ratos Wistar jovens. A importância desses mecanismos também está implícita em

última análise no objetivo terapêutico antes do implante do shunt, de modo que maiores prejuízos possam ser evitados.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. Fundamentação teórica

2.1. Hidrocefalia

Doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC) em desenvolvimento resultam em sérios prejuízos para o indivíduo. O SNC depende da integridade e funcionalidade de suas diversas estruturas que o compõe. Uma destas estruturas é reconhecida como sistema ventricular (SV), composto por uma série de cavidades e canais conectados entre si. Originado a partir do canal central do tubo neural embrionário, o SV é composto pelas seguintes cavidades: ventrículos laterais, terceiro ventrículo e quarto ventrículo. Nestas cavidades ocorrem a produção do LCR pelos plexos coróides, de cerca de 500 ml diariamente em um adulto e 150ml em uma criança, que serão posteriormente absorvidos nas granulações aracnóides, após ter deixado o sistema ventricular e ter percorrido o espaço subaracnóideo (Berardi, Sale & Maffei, 2015).

Para ocorrer absorção deste líquido, o SV conta com canais conectando as suas cavidades, sendo eles: forame interventricular ou de *Monro* (conecta ventrículos laterais e terceiro ventrículo), aqueduto do mesencéfalo ou de *Sylvius* (conecta terceiro ventrículo e quarto ventrículo), e por fim, a abertura mediana ou forame de *Magendie* e as aberturas laterais ou forames de *Luschka* (conectam as aberturas mediana e laterais com os espaços subaracnóideos do encéfalo e do canal da medula).

Este líquido tem a principal função de proteger o encéfalo, seja de traumas mecânicos ou contra o contato de substâncias indesejadas advindas de outras regiões do corpo (Crossman & Neary, 2011). A seguir, a **Figura 1** ilustra o fluxo do LCR indicado pelas setas, projeta-se do interior dos ventrículos para as regiões dos espaços subaracnóideos.

Figura 1: Ilustração da dinâmica liquórica

O líquido é produzido pelo plexo coroado, nos ventrículos cerebrais, circula para o espaço liquórico ao redor do encéfalo e é reabsorvido nas granulações aracnóides. Fonte: Crossman & Neary (2011).

A hidrocefalia ocorre quando há um desbalanço entre formação e absorção de LCR. A partir do acúmulo de líquido no interior do encéfalo, ocorre dilatação ventricular, aumento da pressão intracraniana (PIC), estiramento do corpo caloso, distorção dos grandes vasos cerebrais e redução do fluxo sanguíneo na superfície do encéfalo (Lopes, Slobodian & Del Bigio, 2009; Del Bigio, 2010).

Primeiramente, o aumento da pressão gerada pelo LCR no interior dos ventrículos afeta o epêndima, epitélio responsável pelo revestimento da superfície dos ventrículos cerebrais e do canal central da medula. Em alguns casos graves, este epitélio chega a ser rompido completamente. O plexo coroado, principal responsável pela produção de LCR, sofre alterações menos complicadas em relação ao epêndima, sendo elas: distorções das vilosidades, achatamento e vacuolização das células, com formação de inclusões intracelulares e alargamento dos espaços intercelulares (Lopes; Slobodian & Del Bigio, 2009; Del Bigio, 2010).

A ventriculomegalia pode levar a danos neurovasculares e inflamação através de um aumento de tecido lesionado, responsáveis por comprometer o desenvolvimento neurológico. Em casos de dilatação ventricular aguda, sérios danos no tecido periventricular são ocasionados, levando a isquemia, hipóxia, inflamação e

aumento da pulsação de Líquor (McAllister, 2012; Harris & McAllister, 2012). Em um estado crônico de ventriculomegalia, ocorrem alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica, inflamação crônica, desmielinização, declínio axonal, edema periventricular e prejuízo metabólico (McAllister, 2012).

Outra complicação surge quando se pretende determinar o momento exato em que o procedimento cirúrgico é indicado. Geralmente, o paciente com hidrocefalia possui outras complicações que merecem um cuidado imediato, ou apresentam quadros desfavoráveis quanto à cirurgia, e assim, a instalação da hidrocefalia proporciona prejuízo neurológico durante tal período (McAllister & Chovan, 1998; Dakurah et. al., 2016).

A classificação da hidrocefalia é entendida de duas maneiras: congênita ou adquirida. A primeira refere-se àquela que está ligada a alterações no desenvolvimento durante a gestação, enquanto a segunda refere-se a uma complicação que afeta a saída dos ventrículos, o sistema venoso cerebral ou o espaço subaracnóideo oriundo de um processo patológico desenvolvido após o nascimento (Rekate, 2009).

Outros termos também são utilizados para sua classificação, como: comunicante ou não obstrutiva; não comunicante ou obstrutiva; e de pressão normal. As principais diferenças nestas definições estão ligadas à sua etiologia e síndrome.

A hidrocefalia comunicante é aquela em que ocorre o acúmulo de LCR devido sua excessiva produção ou má absorção, enquanto a hidrocefalia não comunicante ocorre devido a um bloqueio em algum momento durante o fluxo do LCR dentro do sistema ventricular, geralmente por más formações e/ou tumores. Por último, a hidrocefalia de pressão normal é reconhecida por proporcionar um aumento do espaço no interior dos ventrículos, mas sem gerar um aumento da PIC, e ocorre mais comumente em idosos (Rekate, 2009; Kahle et. al., 2016).

Considerada uma das doenças mais comum na clínica neurocirúrgica, a hidrocefalia atinge cerca de 1 e 4 a cada 1000 indivíduos, e este número pode ser maior em países subdesenvolvidos (Tully & Dobyns, 2014). Sua incidência é mais comum na infância, porém, pode acometer o indivíduo em qualquer momento da vida. Um levantamento realizado em 2008 revelou a existência de um gasto anual de 2 bilhões de dólares nos Estados Unidos em tratamentos relacionado à hidrocefalia (Simon et. al., 2008). Apenas na África subsaariana, chega a exceder em 200.000 casos por ano de crianças com hidrocefalia, ocasionado geralmente por infecções

(Warf et. al., 2011). As causas mais comuns em países emergentes são: hidrocefalia pós-hemorragica de nascidos prematuros, mielomeningocele, tumores e estenose congênita do aqueduto (Warf, 2005).

No Brasil, em um estudo clínico-epidemiológico que acompanhou 243 pacientes hidrocefálicos ao longo de 27 anos, as três principais causas conhecidas de hidrocefalia foram: neoplasia do SNC (28%); malformações do SNC (20,1%); meningite purulenta (10,2%). Causas desconhecidas foram registradas em 12,6% dos casos, revelando certa dificuldade em se estabelecer um diagnóstico preciso quanto a sua etiologia (Kliemann & Rosemberg, 2005). Os sinais e sintomas iniciais geralmente consistem em: distúrbios motores (79,4%), macrocrania (62, 1%), cefaléia (29,2%), vômitos (27,6%), alteração da acuidade visual (16.9%), entre outros fatores.

Atualmente, o método mais utilizado para tratamento da hidrocefalia consiste no procedimento cirúrgico para derivação liquórica, que estabelece um caminho alternativo ao fluxo do LCR para sua posterior reabsorção. As três maneiras usuais de tratamento cirúrgico são: derivação ventriculoperitoneal (DVP), derivação ventriculoatrial (DVA), e a terceira ventriculostomia endoscópica (TVE).

Nos casos de DVP e DVA, realiza-se uma cirurgia para a implantação de um cateter unidirecional, regulado por uma válvula de pressão, conectando o ventrículo a uma região específica do corpo, no peritônio em casos de DVP e no átrio direito do coração em casos de DVA, para onde o LCR irá se projetar e ser reabsorvido posteriormente. Para a realização da TVE, o paciente também será submetido a uma cirurgia, porém, o fluxo liquórico é reestabelecido através de uma abertura no assoalho do terceiro ventrículo, o que elimina a necessidade de inserção do cateter (Harris & Mcallister, 2012).

Um dos grandes problemas no tratamento da hidrocefalia se refere à derivação liquórica por implantação de cateter, que por vezes tende a sofrer complicações. Foram registrados 112 casos em que foram necessárias as trocas das derivações liquóricas, diante 243 pacientes estudados, e os fatores são: ocorrência de infecções (57,4%); insuficiência de drenagem (16,8%); obstrução proximal do cateter (15%); migração ou exposição de cateter (2,7%); obstrução distal do cateter (1,8%); traumatismo na válvula (1,8%); abscesso peritoneal (0,9%); hiperdrenagem (0,9%); quebra ou desconexão de cateter (0,9%); perfuração do cateter (0,9%); válvula não-funcionante (0,9%) (Kliemann & Rosemberg, 2005).

A TVE tem se mostrado uma excelente técnica para tratamento da hidrocefalia, principalmente por excluir a possibilidade de complicações associadas às válvulas de drenagem, porém, este procedimento só é indicado em condições específicas, como em casos de bloqueio do fluxo liquórico anterior ao quarto ventrículo, nos demais casos a implantação do *shunt* ainda se faz necessária.

A hidrocefalia constitui um problema de extrema importância para a neurologia e neurocirurgia devido principalmente a três fatores: à grande gama de doenças a qual ela pode estar associada; à quantidade de procedimentos cirúrgicos relacionados ao seu tratamento dentro do volume total da especialidade; e as sequelas que os pacientes estão sujeitos (Del Bigio & Mcallister, 1999). Devido ao alto índice de acometimento da doença e complicações quanto ao seu tratamento, métodos experimentais vêm sendo utilizado para avançar o conhecido acerca da patologia.

2.1.1. Hidrocefalia experimental

O primeiro experimento para indução de hidrocefalia com sucesso em animais ocorreu em 1913. Blackfan percebeu que ao inserir um fragmento de algodão, que gerasse obstrução no aqueduto do mesencéfalo em cães, ocasionava dilatação nos ventrículos próximos ao local da oclusão. Nos anos seguintes, novos estudos foram realizados a fim de confirmar a relação entre obstrução e hidrocefalia (Dandy, 1919).

A hidrocefalia experimental utilizando o método com Caulim foi descrita pela primeira vez em 1932 por Dixon e Heller (Hochwald, 1985). O caulim é um silicato de alumínio hidratado, quando aplicado na saída do quarto ventrículo gera um processo inflamatório causando obstrução no fluxo do LCR para o espaço subaracnóideo. Importante destacar, neste método ocorre apenas o bloqueio do fluxo liquórico, eliminando a possibilidade de lesar diretamente o parênquima cerebral.

Estudos demonstraram que quando induzida a hidrocefalia, durante o estágio agudo, acontece um aumento da PIC, progressiva dilatação dos ventrículos e em consequência disso, aumento do perímetro encefálico. Já no estágio crônico, ocorre estabilização da PIC e da dilatação ventricular. Estudos histopatológicos e imunohistoquímicos revelaram redução importante na espessura do corpo caloso, diminuição do número de oligodendrócitos maduros, lesões axonais, reações astrocitárias e microcitárias, redução na mielinização, e comprometimento da

substância branca periventricular (Del Bigio et. al. 1994; Defeo et. al., 1979; Khan, Enno & Del Bigio, 2006; Lopes, Slobodian & Del Bigio, 2009).

A técnica de indução de hidrocefalia por caulim tem sido demonstrada como um excelente método para estabelecimento da patologia, além do baixo custo que é despendido (Lopes, Slobodian & Del Bigio, 2009). Em estudo que acompanhou a progressão da hidrocefalia induzidas por caulim em ratos durante 28 dias, contando a partir do dia do nascimento, foi verificado a correspondência entre a progressão da doença tanto em animais quanto em humanos, fazendo um paralelo entre a maturação de ambos, o rato com 21 dias de vida é equivalente ao humano com 6 meses de vida (Khan, Enno & Del Bigio, 2006).

Além deste método, outras maneiras de reproduzir a hidrocefalia de maneira experimental têm sido empregadas para estudo da doença. Existe o modelo de ratos H-Tx, são animais que possuem pré-disposição para o desenvolvimento da hidrocefalia (Jones & Bucknall, 1988), ou também camundongos com mutação (Bruni et. al., 1988). Em ambos os modelos, não há uma confiabilidade quanto às perturbações do SNC, se são devido à hidrocefalia exclusivamente ou se há correlação com outras más-formações oriundas da mutação genética.

Outro modelo pode ser criado a partir de dupla aplicação de sangue, volume total de 80 µl, no interior dos ventrículos laterais. Neste método, provoca-se uma hemorragia intraventricular causando dilatação ventricular pós-hemorrágica (Cherian et. al., 2003), porém, em outro estudo percebeu-se que neste caso é difícil estabelecer um quadro de hidrocefalia grave (Balasubramaniam et. al., 2006), o que reduz as possibilidades de estudo.

2.2. Sistema renina-angiotensina

No final do século XIX, mais precisamente em 1898, Robert Tigerstedt e Per Bergman realizavam experimentos em coelhos injetando extratos de rim. Os resultados sugeriam que os rins produziam uma substância, nomeada de renina, que causava aumento da pressão arterial. Posteriormente, em 1930, Goldblatt conduziu novos experimentos em que restringia o fluxo sanguíneo renal de cães. Percebeu-se que os rins isquêmicos de fato lançam uma substância capaz de causar a vasoconstrição. No final da década de 30, notou-se que a renina não era a

responsável direta pelo aumento da pressão sanguínea, mas sua ação catalisava enzimas que eram as substâncias responsáveis. Estas enzimas foram reconhecidas como hormônios peptídicos e nomeadas de angiotensina I (AngI) e angiotensina II (AngII) (Van Epps, 2005).

De forma geral, os peptídeos angiotensinérgicos são formados através do processo limitado de proteólise, principiado pela hidrólise do angiotensinogênio pela renina. Tanto o decapeptídeo angI [Ang-(1-10)] quanto o octapeptídeo AngII [Ang-(1-8)] podem sofrer processo de biotransformação, dando origem a outros peptídeos bioativos menores [angiotensina III, angiotensina IV e angiotensina-(1-7)]. Além da renina e da ECA, outras enzimas são capazes de formar angI (tonina, catepsina G) e angII (quimase) (Dzau & Pratt, 1986; Villapol & Saavedra; 2015), conforme pode ser observado na **Figura 2**.

As ações do SRA são mediadas principalmente pela angII, potente peptídeo biológico relacionado com a etiologia da hipertensão e várias outras formas de doenças cardiovasculares e renais. Este peptídeo exerce suas funções fisiológicas principalmente através do rAT_1 , resultando na influência do controle da pressão arterial. Essas ações incluem vasoconstrição, síntese e secreção de aldosterona e reabsorção tubular de sódio (De Gasparo et. al., 2000).

O rAT_1 têm sido demonstrados estar presente em diversas ações fisiológicas, mediando os efeitos clássicos da angII. Estas ações incluem a manutenção do volume do fluido extracelular e controle do tônus vascular. As suas ações, quando aumentado o nível de estimulação, incluem liberação de endotelina 1 e aumento do estresse oxidativo através da produção de espécies reativas de oxigênio (Bader & Gantem, 2008^[R1]).

Outro receptor bastante estudado e envolvido nas ações fisiológicas da angII são os rAT_2 . Eles são reconhecidos por desempenhar respostas antagônicas ao rAT_1 , resultando em ações de vasodilatação, efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos, além de estimular a produção de óxido nítrico que têm efeitos anti-oxidativos (Saavedra et al, 2006).

Figura 2 Fluxograma representando a cascata metabólica do SRA.

O Angiotensinogênio sofre clivagem da Renina para produção de Angiotensina I. Se houver a interação com a ECA2 será dada origem à Angiotensina (1-10), após contato com a ECA dará origem à Angiotensina 1-7 que se ligará ao Receptor Mas. O Angiotensinogênio em contato com a caliceína resultará na produção de Angiotensina 1-12, após quimase resultará em angiotensina II e poderá resultar em Angiotensina III após contato com a APA, que então se ligará à IRAP. A angiotensina 1-9 pode ser originada também da interação entre Angiotensina I e ECA2. A angiotensina I quando interage com a NEP resulta em Angiotensina 1-7. Na principal via deste sistema, a angiotensina I interage com a ECA e produz a Angiotensina II, principal componente deste sistema. A angiotensina II se liga aos receptores AT1 e AT2 que resulta nas ações fisiológicas do SRA. ECA (enzima conversora de angiotensina); ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2); NEP (endopeptidase neutra); APA (aminopeptidase A); IRAP (membrana regulada por insulina); rAT1 (receptor AT1); rAT2 (receptor AT2). Imagem adaptada de Villapol & Saavedra (2015).

Resultados têm demonstrado que a angII exerce poderoso papel na inflamação, através da estimulação dos receptores de angiotensina, principalmente o rAT₁, responsável por liberar substâncias que têm funções pró-inflamatórias (Saavedra et. al., 2006; Savoia & Schiffrin, 2007; Benicky et. al., 2009).

As lesões vasculares e endoteliais representam um componente patológico importante em diversas enfermidades. O SRA está intimamente relacionado ao desenvolvimento destas lesões em diferentes situações clínicas, promovendo, através da angII, efeitos pró-inflamatórios nos vasos sanguíneos, tais como: estímulo à formação de radicais livres, proliferação celular, migração de células inflamatórias em direção à parede dos vasos, liberação de quimiocinas e citocinas mediada pelo fator nuclear kappa B (NF-κB) (Billet et. al., 2008; Heeneman, Sluimer & Daemen, 2007).

2.2.1 Sistema renina-angiotensina no SNC

Acreditou-se por muito tempo que a renina era produzida exclusivamente pelo rim, porém, em 1971 foi sugerido a sua produção extra renal, inclusive no cérebro, e sua confirmação foi realizada quinze anos depois (Gante, Boucher & Genest, 1971; Dzau et. al., 1986). Todos os componentes do SRA foram identificados no cérebro e têm sido amplamente estudados para identificar a participação deste sistema em diversas doenças neurológicas, além da possibilidade de intervenções terapêuticas (Bader & Ganten, 2002).

O angiotensinogênio é produzido na maioria das regiões do SNC, porém, com maior predominância em algumas regiões, tais como medula espinhal e hipotálamo (Lynch, Hawelu-Johnson & Guyenet, 1987). A principal via de secreção do angiotensinogênio ocorre pelos astrócitos, responsáveis por lançar a proteína no meio extracelular. Ocorre também a expressão do angiotensinogênio em neurônios (Yang et. al., 1999; Mckinley et. al., 2003), e é encontrado em abundância no LCR (Hilgenfeldt, 1984).

A renina tem sido encontrada em níveis baixos no SNC, e em poucas regiões, como cerebelo, hipotálamo e hipófise (Van Thiel et. al., 2017), sugerindo que a angII possa estar sendo produzida a partir de vias alternativas, como por quimase da angiotensina (1-12) (Nakagawa & Sigmund, 2007). A literatura sugere que pesquisas devam ser conduzidas para verificar as vias alternativas de produção de angI e angII (Farag et. al., 2017).

A ECA foi encontrada extensivamente em diferentes regiões do SNC, no endotélio da vasculatura cerebral, plexo coróideo, astrócitos, e principalmente nos órgãos circumventriculares. A angI chega através da circulação periférica e é

convertida localmente em angII para se ligar em receptores específicos na própria região. No plexo coroideo, a ECA é encontrada em alta concentração nas microvilosidades de suas células epiteliais, onde está em contato com o LCR (Van Thiel et. al., 2017). Em experimento que foi realizada transfecção intraventricular de ECA humana em cérebro de ratos, percebeu-se importante aumento da pressão arterial, sendo associado a um aumento significativo do LCR e produção de angII (Nakamura et. al., 1999).

No SNC, os rAT1 têm sido amplamente identificados em diversas regiões, mas com uma presença e maior efetividade no hipotálamo, enquanto os receptores de angiotensina do tipo 2 (rAT2) têm sido identificados em número reduzido. Os efeitos da hiperestimulação desses receptores têm sido demonstrados desempenhar funções antagônicas, enquanto rAT1 é responsável pelos sinais clássicos de hipertensão arterial, o rAT2 desempenha ações fisiológicas como vasodilatação, efeitos anti-inflamatórios e anti-fibróticos (Saavedra et al, 2006).

Estudos sobre este sistema apresentaram importante potencial terapêutico para atuar na manutenção da vasculatura cerebral e influenciar a recuperação e controle da patogênese da isquemia cerebral (Ito et. al, 2002; Wright & Harding 2011; Lou et. al., 2004). As duas classes mais utilizadas de drogas são os iECA (Herman, 1992) e os BRA (Michel et. al., 2013). As principais características do iECA consiste em impedir a conversão de angI em angII pela ECA, enquanto os BRA bloqueiam o local de ligação do rAT1, deixando a ligação livre em rAT2 (Ito et. al, 2002). Estudos mostraram resultados notáveis em condições desfavoráveis que afetam o sistema nervoso, tanto para iECA quanto para BRA (Werner et. al., 1991; Smeda & Daneshtalab, 2011; Saavedra, Sánchez-Lemus & Benicky, 2011).

2.3. Os iECAs e os BRAs

A maioria dos efeitos da angII está dependente da estimulação do seu receptor AT₁ (Saavedra et al, 2006), e a hiperatividade de seu receptor pode promover inflamação vascular periférica e do tecido, além de vasoconstrição, proliferação celular, inflamação, estresse oxidativo, trombogênese e fibrose. (Savoia & Schiffrin, 2007). As principais classes de fármacos que atuam na produção ou ação fisiológica

da AngII são os iECAs e os BRAs, ambos amplamente utilizados para tratamento da hipertensão arterial.

As ações dos iECAs consistem em impedir a conversão da angI em angII pela ECA. A ECA é responsável também por degradar a bradicinina (BK), peptídeo envolvido em diversos processos fisiológicos devido à sua habilidade de ativação de células endoteliais. Possui importante papel como vasodilatador, aumento da permeabilidade vascular, produção de óxido nítrico e mobilização de ácido araquidônico (Kaplan, Joseph & Silverberg, 2002). Suas principais atuações estão relacionadas à regulação de permeabilidade vascular, formação de edemas, migração celular e participação de processos inflamatórios em diferentes órgãos após lesão (Leeb-Lunderbeg et. al., 2005). A BK compõe o sistema calicreína-cinina e todos seus componentes foram encontrados no encéfalo (Chao et. al., 1983).

Estudos utilizando iECA têm revelado papel importante na proteção vascular, reduzindo o estresse oxidativo e a inflamação no endotélio, retardando o remodelamento vascular e também a fibrose perivascular, além de promover vasodilatação. Desta maneira, é possível observar que os iECAS melhoram a flexibilidade vascular e fluxo sanguíneo para os órgãos de destino, tais como coração, rins e cérebro (Fox, 2003; Mehta & Griendling, 2007; Heeneman, Sluimer & Daemen, 2007).

Devido às suas ações farmacológicas, os iECAs são principalmente usados no tratamento de doenças cardíacas. Porém, têm se percebido resultados positivos no seu uso como neuroprotetor em modelos experimentais da doença de Parkinson (Muñoz et. al., 2006; Sonsalla et. al., 2013), e em modelos experimentais de isquemia cerebral em ratos (Werner et.al., 1991; Albert-Weissenberger et. al., 2014).

Os BRAs são usualmente reconhecidos como agentes anti-hipertensivos, por impedir a angII em se ligar ao receptor AT₁, resultando em diversos mecanismos fisiológicos do qual este sistema faz parte, tais como: redução da atividade vasoconstrictora, redução do tônus simpático, melhora da função endotelial e remodelação estrutural dos vasos sanguíneos (BILLET et. al., 2008).

Os efeitos anti-inflamatórios dos BRAs ocorrem através de uma série de fatores, incluindo a reversão da infiltração de macrófagos na vascularização cerebral, que são responsáveis por liberação de citocinas, normalização da síntese de óxido nítrico, reversão da regulação positiva de proteínas de choque de calor, reversão da

necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1B (IL-1B), e a adesão inter-celular (ICAM-1) (Yamakawa et. al., 2003;. Zhou et. al., 2005).

Além disso, BRAs inverteram a estimulação da expressão de mRNA para o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Zhou et. al., 2005), fator de transcrição que desempenha um papel-chave na regulação da resposta imunitária. Percebeu-se papel anti-inflamatório importante através da utilização de um reconhecido BRA durante estudo experimental utilizando um modelo de inflamação cerebral através de Lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) em ratos Wistar, (Benicky et. al. 2011).

O mecanismo básico dos BRAs é o de antagonizar especificamente o rAT_1 , deixando livre o receptor AT_2 . Os antagonistas da angII apresentam perfil farmacodinâmico diferente dos inibidores da ECA, pois não bloqueiam a ECA e, dessa maneira, não aumentam os níveis de bradicinina (Michel et. al., 2013).

A maioria dos iECAs estão em sua forma pró-droga, que depende da conversão para droga ativa após passagem pela mucosa gastrointestinal e pelo fígado. Sua biodisponibilidade depende, entre outros fatores, do fluxo sanguíneo hepático e da integridade dos hepatócitos. Os fármacos desta classe que já estão em sua forma ativa, e não dependem de conversão, são o Captopril e o Lisinopril (Herman, 1992).

A absorção e distribuição do iECA irá depender também de sua lipoficilidade, como também da metabolização por esterases e afinidades por enzimas específicas. Em estudo que comparou as diferenças estruturais e de atuação dos iECAs, o Captopril revelou 70% de biodisponibilidade. Entretanto, essa taxa é reduzida para 30% quando em contato com alimentos. A principal via de eliminação do fármaco ocorre através dos rins e sua meia-vida é de 10 a 12 horas.

A Losartana Potássica é um fármaco da classe dos BRAs, antagonista dos rAT_1 , e comumente utilizada para tratamento da hipertensão e outras complicações cardíacas. Sua biodisponibilidade é de 33% e sofre alterações mínimas na presença de alimentos; possui os metabólitos ativos, com meia-vida de aproximadamente 12h, e ligação protéica de 99,8% (Ribeiro & Florêncio, 2000).

Os efeitos advindos de ambos os fármacos poderão relatar se há uma ligação entre as lesões da hidrocefalia e a angII. No uso do iECA, a angII estará reduzida devido à sua principal via de produção estar sendo inibida, diminuindo sua expressão e aumentando a permanência de Bradicinina no sangue que têm efeitos vasodilatadores, além de auxiliar no recrutamento de macrófagos ao local lesionado.

Na utilização do BRA, a angII estará presente, mas ativando apenas o rAT2 que possuem os efeitos opostos do rAT1, entendidos como efeitos benéficos ao tecido.

JUSTIFICATIVA

3. Justificativa

Mediante à realidade de que nem todos os pacientes com hidrocefalia podem ser beneficiados com o tratamento cirúrgico logo após o diagnóstico, ou aqueles que são tratados em tempo adequado podem apresentar sequelas neurológicas, torna-se pertinente a realização de pesquisas buscando métodos adjuvantes no tratamento desta síndrome neurológica.

Como as lesões vasculares e endoteliais representam um componente patológico importante na gênese das lesões da hidrocefalia, e o SRA têm sido identificados como componente fundamental na manutenção da vasculatura, as drogas que agem no controle desse sistema podem apresentar resultados satisfatórios na recuperação das lesões secundárias desencadeadas pela hidrocefalia.

OBJETIVOS

4. Objetivos

Avaliar possíveis respostas neuroprotetora na hidrocefalia experimental induzida por Caulim utilizando duas classes de fármacos inibidoras do SRA, sendo eles o captopril (iECA) e a losartana potássica (BRA).

4.1. Objetivos específicos

- Avaliação de manifestações clínicas pertinente à progressão da hidrocefalia através de avaliação do ganho ponderal, abertura ocular e sinais clássicos, como macrocrania e abaulamento craniano.
- Avaliar a resposta comportamental através dos testes de Campo Aberto, Monitor de Atividades Espontâneas e Labirinto Aquático de *Morris*.
- Avaliar a espessura e mielinização do corpo caloso através de histoquímica por Solocromo-Cianina.
- Avaliar a citoarquitetura geral do encéfalo através de histoquímica para Hematoxilina-Eosina.
- Avaliar a reação astrocitária em toda a extensão do corpo caloso através de imunoistoquímica para GFAP.
- Avaliar a apoptose celular em toda a extensão do corpo caloso e córtex dorsal por imunoistoquímica para Caspase-3

MATERIAIS E MÉTODOS

5. Materiais e métodos

Todos os procedimentos envolvendo os animais estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo COBEA e aprovados pelo comitê local (CETEA – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP) protocolo 105/2016. Todos os esforços foram feitos a fim de minimizar o sofrimento e a quantidade de animais usados nesta pesquisa.

O estudo utilizou ninhadas de ratos Wistar, machos, com sete dias de vida, oriundas do biotério central, em número suficiente para composição dos grupos experimentais. Cada ninhada foi constituída pela rata-mãe e 8 filhotes, transportados em uma única caixa alojamento, no dia do nascimento, para o biotério da Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Durante a permanência dos animais no biotério, a dieta padrão para roedores e água será oferecida *ad libitum* às mães. Os filhotes em fase de desmame também terão acesso à dieta e à água.

5.1. Formação dos grupos

Os animais (n=40) foram divididos em quatro grupos de 10 animais cada, através dos seguintes critérios:

- Grupo controle (C): os animais receberam injeção intracisternal de solução salina em volume semelhante aos animais que receberam a injeção de caulim.
- Grupo hidrocefalia tratado com salina (HTS): os animais receberam diariamente solução salina (0,9%) via oral em intervalos de 12 horas.
- Grupo hidrocefálico tratado com captopril (HTC): os animais receberam diariamente captopril via oral (0,5mg/kg) em intervalos de 12 horas.
- Grupo hidrocefálico tratado com losartana potássica (HTLo): os animais receberam diariamente losartana potássica via oral (0,5mg/kg) em intervalos de 12 horas.

Todos os animais foram eutanasiados com 14 dias após a injeção de caulim ou salina (total de 21 dias de vida). Os dias foram considerados conforme a indução da hidrocefalia, que foi registrada como P0, e o dia da eutanásia como P14. Em seguida, tiveram seus encéfalos coletados para análise histológica e imunoistoquímica.

Todos os animais foram observados diariamente quanto a possíveis alterações clínicas (perda de peso e desidratação, alterações da marcha e da consciência, negligência com a higiene, entre outros fatores).

5.2. Indução da hidrocefalia

Com 7 dias de idade, os animais foram submetidos à indução da hidrocefalia pelo método da injeção intracisternal de caulim, ou receberam uma injeção de salina, no mesmo local, para formação dos grupos. Cada animal foi posicionado por um auxiliar, flexionando o pescoço do animal, deixando livre a região cervical dorsal. Através da palpação, identificou-se o espaço entre a margem posterior do forame magno, no osso occipital, e a borda cranial do arco dorsal da primeira vértebra cervical. Com uma agulha hipodérmica 0,30 x 13mm, de bisel curto, foi realizado uma punção suboccipital, e injetado, por injeção percutânea lenta, 0,04ml de suspensão de caulim (Merck®) a 15% em água destilada, esterilizada em autoclave, ou solução salina (0,9%). A seguir, os animais foram recolocados em sua caixa alojamento de origem, retornando ao Biotério. O dia da indução foi registrado como P0 e o dia da eutanásia como P14.

Figura 3: Indução de hidrocefalia em rato wistar com 7 dias de vida.

Auxiliar posicionando o animal enquanto o pesquisador realiza a injeção percutânea na cisterna magna com caulim (15%). Fonte: acervo pessoal

5.3. Administração dos fármacos

Os fármacos foram adquiridos em sua forma liofilizada (Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co.,Ltd – China) e pesados diariamente em balança analítica de precisão a fim de alcançar a quantidade referente às dosagens.

Para aplicação do captopril e da losartana potássica, foram diluídos 0,5mg do fármaco em 10ml de solução salina 0,9% e homogeneizado em agitador magnético (Emanuelli, 1998; Shi *et al.*, 2005). Todas as soluções foram preparadas previamente à aplicação no animal, posteriormente seguiram para descarte.

Os animais do grupo HTC e HTLo receberam a medicação de 12 em 12 horas, com início 24 horas pós indução da hidrocefalia, a partir de p1 até p14, última aplicação realizada 12 horas antes da eutanásia. Os animais do grupo HTS receberam

apenas solução salina com mesma frequência dos animais HTC e HTLo. A aplicação da droga, ou da solução salina, ocorreu por via oral através de agulha de gavage (aço inox BD-12, cânula de diâmetro de 1,2mm com esfera de 2,3mm e raio de 40mm, comprimento de 54mm, conforme **Figura 4**) para ratos jovens.

Figura 4: Agulha de gavage utilizada para aplicação dos medicamentos.

Fonte: acervo pessoal

5.4. Estudos comportamentais

5.4.1. Abertura ocular

Os animais foram observados diariamente a fim de identificar o dia em que ocorreu abertura ocular.

5.4.2. Avaliação do peso corporal

Os animais passaram por pesagem diária e os valores foram registrados para avaliação do ganho ponderal.

5.4.3. Teste de campo aberto (*open field*)

O desenvolvimento sensoriomotor dos animais foi mensurado através do teste de campo aberto (*open field*). Os animais eram expostos em uma arena acrílica circular com 60 cm de diâmetro e 50 centímetros de altura, com 12 secções em sua base, conforme **Figura 5**.

Figura 5: Arena do teste de campo aberto

Animal hidrocefálico explorando o ambiente no interior da arena de acrílico. Os animais são observados pelo pesquisador por um período de dois minutos. Ao final do teste a arena é limpa para a realização de novo teste.

O comportamento deambulatório foi avaliado a cada 2 dias, a partir de P6. Cada animal foi observado individualmente por 2 minutos. Os critérios avaliados foram: cuidados de higiene, exploração do ambiente e marcha de acordo com a escala (Lopes, Slobodian & Del Bigio, 2009). Após a observação, cada animal recebia um escore, conforme os seguintes discernimentos:

4 = alerta, com exploração e marcha normal;

3 = discretamente letárgico, com atividade reduzida, mas com marcha normal quando estimulado;

2 = cifótico, caminha, mas a marcha tem base alargada, instável ou atáxica;

1 = mal consegue andar, mas ainda se alimenta;
0 = próximo da morte ou eutanasiado.

5.4.4. Labirinto aquático de *Morris*

Para o estudo da memória e aprendizagem espacial, os animais foram submetidos ao teste do labirinto aquático de *Morris*. O teste é composto por uma piscina circular (100 cm de diâmetro, 50 cm de altura) e uma plataforma transparente (34 cm de altura, oito centímetros de diâmetro) posicionada a dois centímetros abaixo da superfície da água, com temperatura controlada em aproximadamente 22° C (**Figura 6**). O tanque, preenchido com água, é dividido em quatro quadrantes imaginários, numerados em sentido horário (quadrantes 1, 2, 3 e 4). No centro do quadrante designado como 1, a plataforma transparente submersa é colocada.

O teste é realizado em duas fases (adaptação e aprendizagem espacial). Na fase de adaptação, que ocorre em P09, os ratos têm 60 segundos livres para nadar na piscina, sem a plataforma. A seguir, a plataforma é introduzida no tanque e o treinamento é feito em quatro séries, sendo que em cada uma, o animal é colocado na água voltado para um dos quatro pontos cardeais (esse cuidado deve ser tomado para que o filhote memorize a parede iluminada e a use como ponto de referência para localizar a plataforma camuflada sob a superfície da água, e não o encontro ao acaso da mesma pela natação livre em linha reta. Já a fase de avaliação da aprendizagem espacial e memória é realizada em P10 e P11, durante dois períodos (manhã e tarde) com intervalos de 12 horas, e consiste em etapas semelhantes ao do treinamento em cada período.

O principal parâmetro a ser analisado é o tempo despendido pelo animal para encontrar a plataforma em cada um dos períodos, também chamado de latência de fuga. O tempo limite para o animal alcançar a plataforma e ser considerado um acerto é de 60 segundos. No final de cada sessão, o animal é colocado na plataforma para descanso por 15 segundos e, em seguida, recolocado junto à parede da piscina, iniciando uma nova sessão. O tempo gasto do ponto de partida até o encontro da plataforma de descanso foi cronometrado. O tempo médio de cada turno diário é calculado pela média do tempo gasto para o encontro da plataforma em cada uma das quatro sessões. Se o animal não encontra a plataforma em um tempo limite de 60

segundos, ele é colocado na plataforma para descanso por 30 segundos, e o tempo considerado para execução da tarefa naquela sessão é de 60 segundos.

A sala que abriga o tanque é totalmente escura, exceto por uma pequena fonte luminosa fixada próxima a um dos lados externos do tanque (norte), para que o animal identifique o ponto de referência a ser memorizado. **Figura 6:**

Figura 6: Labirinto aquático de morris adaptado

Imagem demonstrando o local de aplicação do teste do labirinto aquático. Percebe-se no canto superior esquerdo a presença da luz que tem como objetivo referenciar o animal quanto ao seu posicionamento na piscina e a localização da plataforma. Fonte: acervo pessoal

5.4.5. Comportamento motor espontâneo

O monitor de atividade é um equipamento destinado à monitoração de movimentos em ratos/cobaias dentro de uma arena cúbica. Os movimentos são monitorados nos eixos x, y, e z, (altura, largura e profundidade). O programa é capaz de reconhecer movimentos circulares, horário e anti-horário, bem como caminhadas,

permanência em pé, período de descanso, com a possibilidade de ser medido o espaço percorrido, o tempo e a velocidade.

O monitor de atividades (EP 149 – Insight, Ltda.) é composto por 16 sensores de infravermelho e caixa de monitoramento em acrílico cristal com dimensão de 50 x 50 cm e 48 cm de altura (**Figura 7**). O equipamento se conecta a um computador através de uma interface serial USB e registra respostas comportamentais de distância percorrida, tempo de atividade, cruzamentos e giros em sentido horário e anti-horário. Após o final de cada sessão é gerado um relatório com planilha de dados em formato Excel para análise dos resultados.

Os animais são avaliados individualmente na primeira (P8) e na segunda semana (P13) após a indução de hidrocefalia durante cinco minutos cronometrados. O teste só pode ser realizado no momento em que todos os animais já tenham feito à abertura ocular, pois em um pré-teste realizado antes do P8, os animais recém-nascidos e com os olhos fechados não exploravam o ambiente e dormiam durante a avaliação.

O teste é realizado já nos primeiros 5 minutos em que os animais têm contato com a plataforma, não realizando o período de habituação que é feito com outras linhagens de animais, pois os ratos da linhagem Wistar perdem o interesse rapidamente e após este período, não exploram mais o ambiente, inviabilizando o teste. Portanto, os animais são colocados na plataforma diretamente para que o deslocamento destinado à exploração real do ambiente seja avaliado.

São observadas as seguintes respostas motoras: distância percorrida (distância percorrida pelo animal durante o período de permanência no monitor e registrada em centímetros), velocidade atingida, cruzamentos (toda vez que o animal se movia, os feixes infravermelhos eram interrompidos e os sensores disparados com finalidade de registro), tempo de atividade (locomução do animal durante seu período de permanência no monitor registrado em segundos) e giros horários e anti-horários (produção de giros durante a permanência no monitor), permanência em pé (quantificação das vezes em que o animal ficou em pé e o tempo nesta atividade). Os critérios para análise comportamental no monitor de atividades foram adotados conforme o trabalho de Bertolino, Dutra & De Araujo (2013), sendo que a observação dos giros anti-horários foi realizada apenas neste trabalho. **Figura 7.**

Figura 7: Monitor de Atividades EP 149 – Insight, Ltda

Os animais são colocados no interior da arena de acrílico e avaliados durante o período de cinco minutos. A arena é limpa a cada novo teste. Fonte: acervo pessoal.

5.5. Coleta das amostras de tecido cerebral

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 1ml/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 sagital, o hemisfério esquerdo foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer (-80°C), reservando o para futuras análises

bioquímicas. O hemisfério direito foi dividido no plano coronal tomando-se como referencial o quiasma óptico. Coronal. As porções anterior e posterior foram mantidas em solução fixadora de paraformaldeído 3%. Adiante, 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.

5.6. Histoquímica e imunoistoquímica

As amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (50% a 100%) diafanizadas em xilol e emblocadas em parafina. Em seguida, para montagem das lâminas, foram cortadas coronalmente em micrótomo rotativo em secções de 5µm de espessura e os cortes estendidos em lâminas histológicas.

Para análise por histoquímica, as lâminas seguiram para estufa (60°C) por uma hora para derretimento da parafina. A seguir, os cortes foram submetidos ao processo de desparafinização, seguidos de banhos sequenciais de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água; posteriormente, corados com hematoxilina e eosina ou solocromo-cianina. Para a coloração por hematoxilina-eosina, analisou-se a presença de edemas, rasgos, e a integridade da organização e extensão da região da matriz germinativa e corpo caloso. Os núcleos das células são corados pela hematoxilina, sendo demonstrados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, sendo considerados em rosa. Com solocromo-cianina, foi realizada a medida da espessura do corpo caloso.

Para imunoistoquímica, as lâminas seguiram para estufa a 60°C, por uma hora, e desparafinizadas em banhos sequenciais de xilol e álcool. São realizados estudos por imunoistoquímica para GFAP para avaliação da distribuição e aspecto morfológico da reação astrocitária na região do corpo caloso e caspase-3 para avaliação da resposta apoptótica. Após recuperação antigênica, quando indicado, pelo método de acidificação e aquecimento (citrato de sódio), será realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 10% em metanol. Posteriormente, faz-se o bloqueio com soro adequado a 10% em PBS, por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, os cortes são incubados “*overnight*” à temperatura de 4°C com o anticorpo

primário [anti-GFAP (DAKO Z0334, Dinamarca), anti-caspase-3 (Santa Cruz sc-7272), em diluições apropriadas, previamente testadas. Retirado o anticorpo primário, adiciona-se o anticorpo secundário apropriado (anticorpo biotinilado de cabra anti-coelho - Santa Cruz Biotechnology SC-2040, ou anti-camundongo - Santa Cruz Biotechnology SC-2039) diluído 1:300 em BSA. A seguir, são incubados com o anticorpo terciário estreptavidina conjugada com HRP (BioLegend cat.405210) diluído 1:160 em PBS. Posteriormente, são revelados com DAB (3,3'-diaminobenzidina - Sigma). Por fim, as lâminas são submetidas à contra coloração com hematoxilina, lavadas em água corrente, desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de álcool e xilol, e recobertas por lamínulas montadas com Permount®. Observação: para a imunistoquímica, os cortes serão estendidos em lâminas histológicas silanizadas.

5.7. Documentação fotográfica

Para documentação fotográfica das lâminas e contagem de células, utilizamos o microscópio Nikon Eclipse E 200 MV com sistema de captura de imagens digitais (MOTICAN 10), com software dedicado em ambiente Windows MOTIC images plus 2.0, adquirido com parte dos recursos FAPESP e instalado no laboratório do grupo de pesquisa.

Para as lâminas coradas com hematoxilina e eosina são fotografadas a região do corpo caloso e matriz germinativa em objetiva de 4x. Para a região do corpo caloso considera-se a presença de edemas, rasgos e organização da comissura, e para região da matriz germinativa consideram-se edemas, rasgos, organização e extensão.

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

Nas lâminas imunomarcadas com GFAP, são fotografados campos demarcados, não sobrepostos, com área mensurada, em toda a extensão do corpo caloso e da matriz germinativa (objetiva de 20x), nos quais é realizada a contagem dos astrócitos reativos e calculada a densidade dos mesmos. Os astrócitos reativos encontrados ao longo da extensão do corpo caloso do hemisfério direito dos cérebros dos animais foram quantificados e a calculado densidade média. Foi realizada a aplicação de escores para avaliação qualitativa da reação astrocitária conforme os

seguintes critérios: 0 (sem astrócitos marcados pelo GFAP); 1 (astrócitos dispersos com processos finos); e 2 (astrócitos hipertróficos abundantes).

Nas lâminas marcadas com anticorpo anti-caspase-3, são fotografados quatro campos demarcados, com área mensurada: dois campos abrangendo as camadas corticais mais profundas (4, 5 e 6), um junto da linha mediana e outro lateral a este, e dois campos nas camadas corticais mais superficiais (1, 2 e 3), em linha com os campos profundos. As células marcadas são contadas dentro destes campos e a densidade das mesmas, calculada.

5.8. Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando testes paramétricos para avaliar a média dos ganhos de pesos e as avaliações das atividades motoras pelo monitor de atividade espontânea (análise de variância - ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey), enquanto testes não-paramétricos (Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn) foram usados para avaliações comportamentais pelo teste de campo aberto e labirinto aquático de morris e análises morfológicas e morfométricas. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

6.0. Resultados

A seguir, imagem de animal hidrocefálico em que é possível observar a macrocrania, manifestação comum em pacientes que sofreram a instalação da hidrocefalia precocemente. Todos os animais submetidos a indução de hidrocefalia apresentaram este sinal.

Figura 8: Animal submetido à indução de hidrocefalia

Imagem de animal hidrocefálico (P10) em que é possível observar a macrocrania, manifestação comum em pacientes que sofreram a instalação da hidrocefalia precocemente. Fonte: acervo pessoal

Na avaliação do período em que ocorre a abertura ocular não houve diferenças entre os grupos, a média de abertura ocular foi percebida em $P6 \pm 1$ dia para todos os grupos.

6.1. Avaliação do peso corporal

Na avaliação da média diária do ganho ponderal, os resultados estão demonstrados na **Figura 9**:

Figura 9 Gráficos demonstrativo da avaliação da progressão do ganho de peso.

C: controle; HTS: hidrocefálicos tratados com salina; HTC: hidrocefálicos tratados com Captopril; HTLo: hidrocefálicos tratados com Losartana Potássica. ($p < 0,05$).

O peso inicial dos animais foi em média de $20\text{g} \pm 1$ e, após a indução, os animais submetidos à hidrocefalia apresentaram atraso no aumento de peso mais acentuado entre os períodos iniciais. A progressão de peso dos animais controle ocorreu de maneira progressivamente linear e estes animais atingiram valores superiores aos demais grupos em todos os períodos.

O peso médio do grupo C foi maior do que o grupo HST em P11 ($p < 0,01$). Em P12 e P13, o grupo C apresentou maior peso que HTS ($p < 0,001$ em ambos os períodos) e HTLo ($p < 0,05$; $p < 0,001$, respectivamente). Em P14, o grupo C mostra maior ganho de peso comparado aos grupos HTS ($p < 0,001$), HTC ($p < 0,05$) e HTLo ($p < 0,001$). Os animais tratados com captopril apresentaram maior ganho de peso dentre os animais hidrocefálicos e uma diferença mais importante foi percebida na comparação entre os grupos HTC e HTS em P12 ($p < 0,05$) e P13 ($p < 0,05$). O peso final médio dos grupos foi: C = $70\text{g} \pm 14$; HTS = $42\text{g} \pm 7$; HTC = $54\text{g} \pm 11$; e HTLo = $47\text{g} \pm 9$.

6.2. Avaliações comportamentais

6.2.1. Teste de campo aberto

Na avaliação do desenvolvimento motor pelo teste de campo aberto, os animais do grupo C demonstram melhor desempenho quanto aos demais grupos em todos os períodos. Entretanto, em P6, os animais de todos os grupos mostraram dificuldades na execução da marcha, apresentando uma curvatura cifótica dorsal, marcha com desequilíbrio e base alargada. Em P8, o grupo C manifestou maior exploração do ambiente, marcha normal e auto higiene adequada que os grupos HTS ($p < 0,01$), HTC ($p < 0,05$) e HTLo ($p < 0,01$). Em P10, o grupo C mostra melhor pontuação que o grupo HTLo ($p < 0,01$). Os resultados estão demonstrados na **Figura 10**: A partir de P12, os animais de todos os grupos apresentaram escores próximos do valor 4.

Figura 9 Gráficos demonstrativos dos resultados obtidos na avaliação do desenvolvimento sensorio motor através do Teste de campo aberto.

C: controle; HTS: hidrocefálicos tratados com salina; HTC: hidrocefálicos tratados com Captopril; HTLo: hidrocefálicos tratados com Losartana Potássica. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.2.2. Labirinto aquático de Morris

Na avaliação da memória e orientação espacial pelo teste do labirinto aquático de Morris, os animais do grupo HTC apresentaram melhor desempenho em todos os períodos quando comparados aos demais grupos. Quando comparados os grupos HTC e C, percebeu-se melhor desempenho do grupo HTC em P10M ($p<0,05$) e P10T ($p<0,05$). Na comparação dos grupos HTS e HTC, houve melhor desempenho do grupo HTC em P10M ($p<0,05$), P10T ($p<0,01$), P11M ($p<0,05$), e P11T ($p<0,01$). Comparando os grupos HTC e HTLo, os animais do grupo HTC tiveram melhor desempenho em P10M ($p<0,01$), P10T ($p<0,05$), P11M ($p<0,05$), e P11T ($p<0,01$). Os resultados estão demonstrados na **Figura 11**:

Figura 10 Gráficos demonstrativos dos resultados obtidos na avaliação da memória espacial através do Labirinto aquático de Morris.

C: controle; HTS: hidrocefálicos tratados com salina; HTC: hidrocefálicos tratados com Captopril; HTLo: hidrocefálicos tratados com Losartana Potássica. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

6.2.3. Monitor de atividade espontânea

No monitor de atividade espontânea, os animais HTC perambularam por uma distância maior em p8 (média de 70cm / min) e p13 (média de 110cm / min) quando comparados aos outros grupos. As diferenças foram observadas em p13, comparando HTC x C ($p < 0,05$), HTC x HTS ($p < 0,01$) e HTC x HTLo ($p < 0,05$). Na avaliação do tempo de repouso, os animais do grupo HTC apresentaram menor tempo de repouso em p8 (média de 0,8s / min) e p13 (média de 0,5s / min). Em p13 HTC x C ($p < 0,05$). Para verificar a exploração vertical, os animais do grupo HTC apresentaram a maior

quantidade de exploração vertical em p8 (média 9 / min) e p13 (média de 22 / min). Diferenças foram observadas em p8, comparando HTC x HTLo ($p < 0,01$). Em p13, observaram-se diferenças comparando HTC x HTS ($p < 0,05$).

Figura 11 Gráfico representativo dos resultados obtidos na avaliação da atividade espontânea através do monitor de atividade.

C: controle; HTS: hidrocefálicos tratados com salina; HTC: hidrocefálicos tratados com Captopril; HTLo: hidrocefálicos tratados com Losartana Potássica. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

6.3. Avaliações histológicas

6.3.1. Coloração por hematoxilina-eosina

A avaliação revelou resultados esperados para os animais controles, o corpo caloso se mostrou íntegro, como um conjunto compacto de fibras nervosas e camada endimária contínua, composto por um epitélio cúbico simples de núcleos celulares centralizados. Entre os animais dos grupos hidrocefálicos, o corpo caloso se apresentou comprimido e estirado com sinais de edema e rasgos, que podem ser vistos como espaçamento/esgarçamento entre suas fibras. Em alguns ratos com hidrocefalia gravíssima, o corpo caloso se mostrou completamente comprometido, principalmente na linha mediana do cérebro. O comprometimento endimário ocorreu em nível de acordo com o tamanho da dilatação ventricular. Quando a hidrocefalia alcançou níveis mais importantes, o epêndima esteve composto por células achatadas com pontos de rotura e até mesmo desnudamento endimário de quase todo o teto do ventrículo lateral, enquanto o corpo caloso

A região da matriz germinativa, localizada no ângulo externo dos ventrículos laterais, se apresenta como uma população de células em grande número, com núcleos celulares fortemente corados de azul, semelhante ao que foi observado nos animais do grupo C após análise do tecido corado por Hematoxilina-Eosina. Nos animais hidrocefálicos é possível perceber os ventrículos laterais dilatados quando comparados aos animais do grupo C, que em seu estado saudável possuem os ventrículos laterais percebidos como fendas. Nos ratos hidrocefálicos, por outro lado, notou-se redução da população de células da matriz germinativa, principalmente nos animais do grupo HTC e HTS. Nos animais do grupo HTLo, apesar da diminuição da densidade celular, nota-se um nível de integridade maior quando comparado aos demais grupos hidrocefálicos. Em casos mais graves de ventriculomegalia, observou-se ausência completa de MG.

Figura 12: Fotomicrografias do encéfalo (região do corpo caloso e matriz germinativa) de ratos Wistar com coloração histológica por Hematoxilina-Eosina.

A e B animais do grupo C; **C e D** animais do grupo HTC; **E e F** animais do grupo HTLo; **G e H** animais do grupo HTS. Região do corpo caloso (esquerda) e matriz germinativa (direita).

6.3.2. Coloração por Solocromo Cianina

Na avaliação da espessura do corpo caloso por coloração de solocromo-cianina, os resultados estão demonstrados nas **Figura 14 e 15**:

Figura 13 Fotomicrografias dos encéfalos (região do corpo caloso) de ratos com coloração histológica por Solocromo -Cianina

Animal controle (**A**), animal hidrocefálico tratado com Captopril (**B**), animal hidrocefálico tratado com Losartana Potássica (**D**), e animal hidrocefálico tratado com salina (**E**).

Figura 14 Gráfico demonstrativo da avaliação da espessura (média) do corpo caloso.

C: controle; HTS: hidrocefálicos tratados com salina; HTC: hidrocefálicos tratados com Captopril; HTLo: hidrocefálicos tratados com Losartana Potássica (HTLo). * $p < 0,05$.

O grupo **C** apresentou maior espessura do corpo caloso quando comparado aos demais grupos. Quando comparado os grupos **C** e **HTS**, o grupo **C** apresentou maior espessura do corpo caloso ($p < 0,5$). Na comparação do grupo **C** com o grupo **HTC**, o grupo **C** demonstrou maior resultado ($p < 0,5$). Comparando os grupos **C** e **HTLo**, o resultado com maior espessura do corpo caloso foi do grupo **C** ($p < 0,5$). Em comparação entre os grupos para avaliar os níveis de mielinização, a coloração não foi sensível para verificar diferenças nesta análise.

6.4. Avaliação por imunoistoquímica

6.4.1. GFAP

Os animais do grupo C apresentou menor população de astrócitos reativos na região do corpo caloso em comparação com o grupo HTS ($p < 0,05$). A

imunoistoquímica para o GFAP revelou melhores resultados para os animais HTLo quando comparados aos animais HTS e HTC (**Figura 16**). A média de reação astrocitária encontrada na região do corpo caloso dos animais HTLo foram próximas dos resultados encontrados para os animais do grupo C. As densidades média de astrócitos reativos foram obtidas nos seguintes valores: C = $6,61/\text{mm}^2 \pm 2,15$; HTS = $27,46/\text{mm}^2 \pm 6,76$; HTC = $19,08/\text{mm}^2 \pm 5,37$; HTLo = $8,73/\text{mm}^2 \pm 4,30$.

Figura 15 Fotomicrografia do encéfalo (região do corpo caloso) de ratos Wistar após imunoistoquímica para GFAP

A animal C; **B** animal HTS; **C** animal HTC; **D** animal HTLo. Ampliação objetiva: 20x. Gráficos que mostram o número médio de astrócitos reativos identificados na região do corpo caloso (gráfico esquerdo) e o escore médio obtido de acordo com a qualidade do astrócitos reativo (gráfico direito). * $p < 0,05$

A aplicação de escores revelou maior ausência de astrócitos marcados para o grupo C (escore = $0,26 \pm 0,17$). Os animais do grupo HTS (escore = $1,14 \pm 0,13$) e HTC (escore = $0,91 \pm 0,25$) apresentaram uma população de astrócitos dispersos com processos finos. Os animais do grupo HTLo (pontuação = $0,49 \pm 0,19$) revelaram baixo número de astrócitos reativos.

6.4.2. Caspase 3

A avaliação da Caspase-3 no corpo caloso revelou uma pequena presença de células apoptóticas nos animais C (**Figura 17**). Entre os animais hidrocefálicos, o grupo HTC apresentou menor número de células em apoptose na região do corpo caloso. O menor número de células apoptóticas foi encontrado no grupo C quando comparado com o grupo HTLo ($p < 0,01$). A densidade média de células em apoptose encontrada na região do corpo caloso foi $C = 2 \pm 0,5$; $HTS = 15 \pm 4,44$; $HTC = 13 \pm 3,73$; e $HTLo = 16 \pm 1,87$.

A análise do córtex profundo mostrou que os animais C também apresentavam menor densidade de células em apoptose, seguidos pelos animais HTLo, HTS. O grupo com maior densidade média de células em apoptose no córtex profundo foi o HTC. A densidade média de células em apoptose encontrada na região do córtex profundo foi $C = 5 \pm 1,10$; $HTS = 7 \pm 1,16$; $HTC = 7 \pm 1,71$; $HTLo = 6 \pm 0,8$. A avaliação do córtex superficial revelou menor densidade média de células em apoptose nos animais do grupo C, seguidas pelos animais do grupo HTS, HTLo e HTC. A densidade média de células em apoptose encontrada na região do córtex superficial foi $C = 3 \pm 0,66$; $HTS = 5 \pm 0,62$; $HTC = 5 \pm 1,75$; $HTLo = 5 \pm 0,66$.

Figura 16 Fotomicrografia da região do corpo caloso, córtex profundo e córtex superficial após imunoistoquímica para Caspase-3.

A: animal C (corpo caloso); **B:** animal C (córtex profundo); **C:** animal C (córtex superficial); **D:** animal HTC (corpo caloso); **E:** animal HTC (córtex profundo) da; **F:** animal HTC (córtex superficial); **G:** animal HTLo (corpo caloso); **H:** animal HTLo (córtex profundo); **I:** animal HTLo (córtex superficial); **J:** HTS animal (corpo caloso); **L:** animal HTS (córtex profundo); **M:** animal HTS (córtex superficial). Corpo caloso: objetiva de 20x. Córtex profundo e córtex superficial: objetiva de 10x. **N** Gráficos demonstrativo da média de células em apoptose identificadas na região do corpo caloso. **O** Gráficos demonstrativo da média de células em apoptose no córtex profundo. **P** Gráficos demonstrativo da média de células em apoptose.

** p < 0,01; Barra: 100µm

DISCUSSÃO

7. Discussão

A hidrocefalia ainda permanece sendo amplo objeto de pesquisa, algumas das prioridades consistem na busca por terapias farmacológicas destinadas a atenuar lesões secundárias, como isquemia e trauma tecidual, antes e após o procedimento cirúrgico, como tratamento adjuvante (McAllister et al., 2015, Del Bigio & Di Curzio, 2016). À medida que as lesões vasculares e endoteliais representam um importante componente patológico na gênese das lesões de hidrocefalia (Khan, Enno & Del Bigio, 2006; McAllister et al., 2015), o captopril e a losartana potássica apresentam indicadores favoráveis para a manutenção da vasculatura e melhora do suprimento sanguíneo ao cérebro. Estes fármacos têm demonstrado superar a barreira hematoencefálica e atuar sobre os mecanismos envolvidos no SRA local, inclusive apresentaram capacidade de restaurar a autorregulação do fluxo sanguíneo cerebral em condições desfavoráveis (Lou et al., 2004, Wright & Harding 2011, Smeda & Daneshtalab, 2011).

Desta maneira, buscamos analisar, de forma inédita, os efeitos comportamentais e teciduais do captopril e da losartana potássica na hidrocefalia induzida por caulim em ratos Wistar com 7 dias de vida. Os resultados foram comparados com animais da mesma linhagem que passaram pelo mesmo processo de indução da hidrocefalia e receberam diariamente solução salina, ou animais que permaneceram sem a indução da hidrocefalia. A utilização do caulim para indução de hidrocefalia em animais consiste no método experimental mais utilizado por pesquisadores, os motivos principais são o baixo custo e a reprodução eficaz das condições neurológicas pertinentes à hidrocefalia. Após aplicação do caulim, ocorre uma obstrução mecânica em consequência da inflamação local que impede a circulação líquórica na saída do IV ventrículo, resultando no acúmulo de Líquor no interior dos ventrículos cerebrais (Lopes, Slobodian & Del Bigio, 2009). O período de vida dos animais usados ocorreu em consequência da similaridade de maturação neurológica, o animal com 21 dias de vida pós-natal é equivalente a um humano com 6 meses de vida pós-natal. (Khan, Enno & Del Bigio, 2006).

Inicialmente, após indução da hidrocefalia e formação dos grupos experimentais, avaliamos diariamente o ganho de peso, que consiste em um aspecto clínico importante na avaliação da saúde, principalmente em período inicial de vida

(Hayes et al., 2017), além de fornecer dados importantes sobre níveis de desidratação dos animais hidrocefálicos. Em período inicial, após indução da hidrocefalia, os animais hidrocefálicos apresentaram um menor interesse pela busca por alimento, comportamento este que tem sido atribuído ao sofrimento oriundo do procedimento invasivo. A maioria dos estudos realizados com hidrocefalia experimental mostrou um menor ganho de peso de animais após a indução de hidrocefalia, especialmente naqueles que desenvolvem hidrocefalia severa (Khan, Enno & Del Bigio, 2006; Catalão et al., 2014; Garcia et al., 2017). Estes achados podem estar relacionados à apatia e à perda de apetite como consequência da hidrocefalia (Lopes, Slobodian & Del Bigio, 2009; Shaolin et al., 2015).

Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram maior ganho de peso de animais hidrocefálicos tratados com captopril em comparação com aqueles tratados com solução salina. A expressão de apetite envolve mecanismos psicobiológicos organizados em níveis que interagem uns com os outros. Os eventos psicológicos (percepção de fome e sensações hedônicas) e as operações comportamentais (disponibilidade e atividade de ingestão alimentar), metabolismo periférico e interações entre neurotransmissores e metabolismo cerebral estão intimamente envolvidos neste comportamento (Ely et al., 1997; Yau & Potenza, 2013).

Estudos investigaram respostas de ansiedade e alterações neuroquímicas na hidrocefalia induzida por caulim e foi percebido aumento significativo da ansiedade em animais associado ao comprometimento funcional do sistema dopaminérgico (Ishizaki et al., 2000; Hwang, Shim & Chang, 2011) e sistema colinérgico (Ishizaki et al., 2000). Fatores envolvidos em animais experimentais, como ansiedade e neofobia, devem ser entendidos para a medição de resultados importantes em nossa avaliação clínica e comportamental. Este tipo de exposição pode causar medo e curiosidade, que dependem dos níveis de ansiedade para demonstrar o comportamento. Em níveis elevados de ansiedade, a neofobia (medo de um ambiente novo) pode superar a curiosidade, enquanto que, com baixos níveis de ansiedade, a curiosidade supera a neofobia e o animal tem um comportamento exploratório de maior intensidade (Griebel et al., 1993; Antunes et al., 2011).

Os animais hidrocefálicos tratados com captopril também mostraram resultados satisfatórios na atividade motora espontânea e em testes de campo aberto. Estes resultados, embora não indiquem de forma objetiva um melhor desenvolvimento motor de animais hidrocefálicos tratados com captopril, sugerem que eles influenciam os

fatores relacionados à ansiedade que podem ser desencadeados em animais expostos a ambientes incomuns (Griebel et al., 1993; Antunes et al., 2011) ou pela própria ansiedade que a hidrocefalia pode causar em animais (Ishizaki et al., 2000; Hwang, Shim & Chang, 2011).

As principais vantagens do teste de campo aberto motora são suas possibilidades de aplicação. Consiste em um método não invasivo de avaliação motora e sem necessidade de manipulação dos animais durante o teste. Não é necessário treinamento especial, os animais são relativamente livres de estresse e fornece indicadores essenciais para o grau de comprometimento locomotor em modelos animais. Os animais em P6 revelaram comportamento dentro dos padrões em ratos com essa idade, pois o encéfalo do animal não completou o seu desenvolvimento e maturação (Tatem *et. al.*, 2014). A partir de P8, os animais do grupo C desempenham maior exploração na arena, um padrão de marcha menos alargado, auto-higiene, em comparação aos animais hidrocefálicos. Neste momento foi possível notar que os animais controles apresentaram um comportamento motor mais adequado que os animais hidrocefálicos, inclusive comparado aos animais que receberam captopril. Apesar dos animais do grupo HTC apresentarem maior atividade exploratório no teste do monitor de atividade espontânea, os resultados do teste de campo aberto sugerem que a atividade exploratória destes animais pouco tem a ver com desenvolvimento motor.

Um experimento proposto para comparar captopril e losartana potássica mediante teste de esquiva ativa para avaliação do aprendizado e da memória, os animais que receberam captopril exibiram menor tempo de latência para encontrar a plataforma (Raghavendra, Chopra & Kulkarni, 2001). Neste teste o animal é exposto a uma arena retangular, onde são emitidos choques na parte em que o animal deambula, com exceção de uma plataforma também localizada no interior da arena que serve como zona de proteção para onde o animal deve escapar. Porém, neste mesmo estudo foi avaliado a atividade locomotora e nociceção destes animais, indicando que a droga parece não influenciar em efeitos moduladores do movimento corporal e comportamento sensoriomotor. O captopril mostra estimular os animais a explorar o ambiente com maior intensidade, podendo estar relacionado a influências nos graus de ansiedade gerados pela exposição de um novo ambiente (Costall et al., 1990).

Em última análise, pensamos que o aumento da atividade dos animais HTC pode estar associado aos sintomas da hiperatividade, mas o Captopril mostrou ser capaz de reduzir a hiperatividade e a impulsividade em camundongos (Porter et al., 2015). Embora não seja possível inferir se houve redução do sofrimento ou influência em efeitos neuromoduladores nos animais hidrocefálicos que receberam captopril, os resultados apontam uma melhor adaptação destes animais à condição imposta pela hidrocefalia quando comparado aos animais que receberam apenas solução salina, tanto em relação ao autocuidado quanto à atividade exploratória e aprendizado e memória.

Os traumas mecânicos causados pela instalação de hidrocefalia puderam ser observados através da coloração histoquímica por HE. Devido à proximidade que o corpo caloso e a matriz germinativa são dos ventrículos laterais, a principal cavidade do acúmulo de LCR, essas estruturas são as primeiras a se ferir em um processo de ventriculomegalia. A presença de edema e rasgos foi semelhante em todos os animais hidrocefálicos, bem como o compromisso da organização estrutural. O tratamento com Captopril e Losartan não mostrou nenhum benefício na restrição de lesões causadas por ventriculomegalia, como edema, rasgos e picnose.

Enquanto a dilatação ventricular ocorre, o tecido cerebral sofre compressão e alongamento, prejudicando principalmente os axônios da substância branca periventricular (Del Bigio et al., 2012). As lesões nos axônios da substância branca periventricular mostraram ser mediadas por mecanismos proteolíticos ativados por Ca^{++} causados por ventriculomegalia (Del Bigio, 2000). Esses mecanismos são desencadeados devido ao alongamento axonal ou hipoperfusão local, ambos identificados em cérebros hidrocefálicos (Del Bigio, 2010). Após isquemia cerebral ou trauma, esses mecanismos também estão envolvidos em danos neuronais (McAllister & Chovan, 1998). A fisiopatologia do declínio cerebral induzida por isquemia foi sugerida para estar relacionada ao estresse oxidativo gerado pela NADPH oxidase (Infanger, Sharma e Davisson, 2006) e angII tem mostrado aumentar o estresse oxidativo através da ativação de NADPH no tecido cerebral (Yamamoto et al., 2008).

Nosso estudo mostra que os animais hidrocefálicos tratados com captopril revelaram um grande número de astrócitos reativos em comparação com os animais controle, porém, menores do que os animais hidrocefálicos sem tratamento. Os achados mais importantes quanto à redução da reatividade astrocítica estão relacionados aos animais hidrocefálicos tratados com losartana potássica. Na análise

morfológica desses animais, observamos uma redução ainda maior de astrócitos em comparação com os animais hidrocefálicos sem tratamento, apresentando densidade média próxima à encontrada nos animais controle.

A literatura tem apontado que angII pode estimular a resposta imune através da ativação de rAT_1 e causar danos metabólicos através da hiperestimulação (Füchtbauer et al., 2011; Kandalam & Clark, 2010). Os efeitos encontrados podem sugerir relação entre redução da densidade reativa dos astrócitos e expressão de rAT_2 , uma vez que apenas os animais hidrocefálicos tratados com losartan apresentaram redução na densidade média de astrócitos reativos e a principal característica do losartana potássica é de inibir os rAT_1 , enquanto os sítios de ligação dos rAT_2 permanece livres para estimulação por angII. Os rAT_2 possuem ações fisiológicas opostas à rAT_1 , como vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo, crescimento de neuritos, proliferação celular reduzida e excitabilidade neural que desempenham ações anti-inflamatórias e conseqüentemente redução da atividade reativa astrocítica (Phillips & Oliveira, 2008; Wright & Harding, 2011; Guimond & Gallo-Payet, 2012).

A circulação sanguínea prejudicada produz uma série de efeitos complexos que influenciam os mecanismos apoptóticos (Nagy & Nardai, 2017) e aumentam a atividade da renina (Dong et al., 2011). Nossos resultados sugerem que não há relação importante entre diminuição ou inibição da expressão angII e apoptose celular nas regiões do corpo caloso e no córtex dorsal dos animais hidrocefálicos. A hipoperfusão no sangue no cérebro tem sido associada a um aumento da atividade da renina e o receptor pró-renina estimulado apresenta respostas fisiológicas relacionadas à apoptose, bem como a vasoconstrição, hipertrofia e proliferação celular no sítio da lesão (Phillips & Oliveira, 2008; Guimond & Gallo-Payet, 2012). O captopril e a losartana potássica não atuam diretamente na renina, apenas na ECA e na RAT_1 , permitindo que a renina se ligue ao site e expresse a resposta fisiológica. A presença elevada de células na apoptose pode estar ligada tanto às lesões causadas pela hidrocefalia quanto às ações fisiológicas decorrentes da ligação da renina ao receptor (Del Bigio, 2010; Wright & Harding, 2011; Phillips & Oliveira, 2008; Dong et al., 2011).

Outros fatores que justificam a presença de células em apoptose no SNC de todos os animais aqui estudados, inclusive nos animais controles, são pertinentes ao próprio desenvolvimento neurológico natural. O desenvolvimento do cérebro é

mediado, dentre outros fatores, pelo equilíbrio entre proliferação e morte celular programada. O processo de apoptose celular é fundamental para regular o tamanho e o formato do sistema nervoso em mamíferos (Kuan et. al., 2000). A caspase-3 está intimamente relacionada com esta morte celular programada, em estudo avaliando sua participação na morte celular programada verificou que a deficiência desta proteína alterou a incidência normal de apoptose de células progenitoras neuronais, inclusive os resultados sugerem que ela regula, independentemente, a apoptose de células fundadoras neuronais (Roth et. al., 2000).

Em estudo realizado por HUANG e colaboradores (2017), foi utilizado três diferentes classes de inibidores do SRA, o Aliscireno (inibidor do receptor de renina), o Enalapril (iECA) e o Candesartan (BRA), para avaliar os efeitos no aprendizado e memória e a apoptose celular no hipocampo e córtex dorsal de ratos submetidos a um modelo de isquemia cerebral crônica. Os resultados indicam que os fármacos foram eficientes em reduzir a atividade do SRA nas regiões estudadas, demonstrando eficiência das drogas em ultrapassar a barreira hematoencefálica e atuar no SNC. Ainda, os fármacos foram eficientes em reduzir o tempo de latência no teste do labirinto aquático de *Morris*, como também reduziram atividade apoptótica no hipocampo dos animais avaliados. Embora o SRA esteja envolvido em alterações vasoativas, a hidrocefalia é uma síndrome complexa e possui diversos mecanismos que influenciam na instalação e progressão das lesões a ela relacionada. Os danos metabólicos ocasionados pela compressão e estiramento do tecido cerebral devem ser melhor compreendidos para entender qual o papel do SRA na hidrocefalia e quais são advindos de outras cascatas fisiológicas envolvidas na homeostase encefálica.

Este trabalho mostrou informações preliminares importantes que indicam que o SRA pode atuar em mecanismos envolvidos nas lesões da hidrocefalia. Nossos achados demonstram aumento de peso e atividade motora espontânea em animais hidrocefálicos tratados com captopril e parecem estar relacionados a fatores de ansiedade. A inibição da rAT_1 mostra influenciar a resposta dos astrócitos reativos no corpo caloso dos cérebros hidrocefálicos, reduzindo a possibilidade de danos resultantes de cicatrizes astrocíticas. Na redução da apoptose celular, os resultados não foram tão satisfatórios como esperávamos, o que sugere uma maior participação da renina neste processo fisiológico proveniente da lesão tecidual. A hiperatividade de renina resultante da hipoperfusão sanguínea no cérebro parece desempenhar um papel importante nas lesões isquêmicas, estudos com fármacos que atuam inibindo

as ações desta enzima podem revelar resultados importantes para entender seu papel na fisiopatologia da hidrocefalia. Uma nova rota de pesquisa e experiências estão em andamento com o objetivo de avaliar a participação da renina na fisiopatologia da hidrocefalia buscando propor terapias farmacológicas atuando no SRA como um método complementar ao tratamento cirúrgico atual.

Conclusão

8. Conclusão

- Todos os animais submetidos à injeção intracisternal de caulim desenvolveram hidrocefalia, os sinais clássicos como macrocrania e abaulamento craniano foi percebido em todos os animais hidrocefálicos.
- A hidrocefalia influenciou o comportamento alimentar dos animais, ocorreu atraso no ganho de peso dos animais. O captopril contribuiu positivamente no ganho ponderal dos animais hidrocefálicos.
- Os animais tratados com captopril demonstram um comportamento exploratório mais ativo, além de melhor desempenho na avaliação da aprendizagem e memória.
- As avaliações histológicas evidenciam o papel prejudicial que a hidrocefalia exerce na matéria branca periventricular e estruturas adjacentes.
- Os animais tratados com losartana potássica apresentaram redução da atividade astrocitária reativa na extensão do corpo caloso, evidenciada pela imunomarcção para GFAP.
- Os fármacos, nas doses testadas, não foram eficazes em reduzir a presença de células em processo apoptótico, tanto na extensão do corpo caloso quanto no córtex dorsal do hemisfério direito dos animais hidrocefálicos, evidenciado pela imunomarcção para Caspase-3.

REFERÊNCIAS

9. Referências

ANTUNES, F. D. et al. Automation of the free-exploratory paradigm. **J Neurosci Methods**, v. 197, n. 2, p. 216-20, Apr 2011.

BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **J Mol Med (Berl)**, v. 86, n. 6, p. 615-21, Jun 2008.

BALASUBRAMANIAM, J. et al. Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. **Exp Neurol**; v. 197, n. 1, p. 122-32, Jan 2006.

BENICKY, J. Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery. **Cell Mol Neurobiol**; v. 29, n. 6-7, p. 781-92, 2009.

BERARDI, N.; SALE, A.; MAFFEI, L. Brain structural and functional development: genetics and experience. **Dev Med Child Neurol**, v. 57 Suppl 2, p. 4-9, Apr 2015.

BERTOLINO, G.; DUTRA SOUZA, H. C.; DE ARAUJO, J. E. Neuropathology and behavioral impairments in Wistar rats with a 6-OHDA lesion in the substantia nigra compacta and exposure to a static magnetic field. **Electromagn Biol Med**; v. 32, n. 4, p. 527-35, 2013.

BILLET, S. et. al. Role of angiotensin II AT1 receptor activation in cardiovascular diseases. **Kidney Int**; v. 74, p. 1379–1384, 2008.

BRUNI, J. E. et al. Hereditary hydrocephalus in laboratory animals and humans. **Exp Pathol**; v. 35, n. 4, p. 239-46, 1988.

CATALÃO, C. H. et al. Camellia sinensis neuroprotective role in experimentally induced hydrocephalus in Wistar rats. **Childs Nerv Syst**, v. 30, n. 4, p. 591-7, Apr 2014.

CATALÃO, C. H. R. et al. Environmental enrichment reduces brain damage in hydrocephalic immature rats. **Childs Nerv Syst**, v. 33, n. 6, p. 921-931, Jun 2017.

CHAO, J.; WOODLEY, C.; CHAO, L.; MARGOLIUS, H.S. Identification of tissue kallikrein in brain and in the cell-free translation product encoded by brain mRNA. **J Biol Chem**; 25;258(24):15173-8, 1983.

CHERIAN, S. S. et al. Posthemorrhagic ventricular dilation in the neonate: development and characterization of a rat model. **J Neuropathol Exp Neurol**; v. 62, n. 3, p. 292-303, 2003.

COSTALL, B. et al. Effects of captopril and SQ29,852 on anxiety-related behaviours in rodent and marmoset. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 36, n. 1, p. 13-20, May 1990.

CROSSMAN, A. R.; NEARY, D. Neuroanatomia ilustrada. [trad. Cristiane Regina Ruiz] – 4.ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

DAKURAH, T. K. et al. Management of Hydrocephalus with Ventriculoperitoneal Shunts: Review of 109 Cases of Children. **World Neurosurg**, Jul 2016.

DANDY, W. E. Experimental hydrocephalus. **Ann Surg**, v. 70, n. 2, p. 129-42, 1919.

DE GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J.W.; UNGER, T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. **Pharmacol. Rev**; v. 52, n. 3, p. 415–472, 2000.

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, Jan, p.70-4. 1979.

DEL BIGLIO, M. R. et al. Acute and chronic cerebral white matter damage in neonatal hydrocephalus. **Can J Neurol Sci**; v. 21, n. 4, Nov, p.299-305. 1994.

DEL BIGIO, M. R.; MCALLISTER II, J. P. Hydrocephalus - Pathology. In: CHOUX, M., DI ROCCO, C. AL, E. **Pediatr Neurosurg**; Londres: Churchill Livingstoneed. p.217-236, 1999.

DEL BIGIO, M. R. Calcium-mediated proteolytic damage in white matter of hydrocephalic rats? **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 59, n. 11, p. 946-54, Nov 2000.

DEL BIGIO, M. R. Neuropathology and structural changes in hydrocephalus. **Developmental disabilities researcher views**; 16–22, 2010.

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

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

DONG, Y. F. et al. Attenuation of brain damage and cognitive impairment by direct renin inhibition in mice with chronic cerebral hypoperfusion. **Hypertension**, v. 58, n. 4, p. 635-42, Oct 2011.

DZAU, V. J. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. **Circulation**; v. 77, suppl I, p. I-4–I-13, 1998.

DZAU, V. J.; PRATT, R. E. Renin-angiotensin system: biology, physiology and pharmacology. In: Haber E, Morgan H, Katz A, Fozard H. **Handbook of Exp Card**; New York, Raven Press, pp. 1631-61, 1986.

ELY, D. R. et al. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. **Physiol Behav**, v. 61, n. 3, p. 395-8, Mar 1997.

EMANUELI, C. et al. Acute ACE inhibition causes plasma extravasation in mice that is mediated by bradykinin and substance P. **Hypertension**, v. 31, n. 6, p. 1299-304, Jun 1998.

FARAG, E. et al. The renin angiotensin system and the brain: New developments. **J Clin Neurosci**, Sep 2017.

FOX, K.M. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, doubleblind, placebocontrolled, multicentre trial (the EUROPA study). **Lancet**; v. 362, p. 782–788, 2003.

FÜCHTBAUER, L. et al. Angiotensin II Type 1 receptor (AT1) signaling in astrocytes regulates synaptic degeneration-induced leukocyte entry to the central nervous system. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 5, p. 897-904, Jul 2011.

GANTEN, D.; SPECK, G. The brain renin-angiotensin system: a model for the synthesis of peptides in the brain. **Biochem. Pharmacol**; v. 27, n. 20, p. 2379–2389, 1978.

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

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

GUIMOND, M. O.; GALLO-PAYET, N. The Angiotensin II Type 2 Receptor in Brain Functions: An Update. **Int J Hypertens**, v. 2012, p. 351758, 2012.

HARRIS, C. A., MCALLISTER, J. P. 2ND. what we should know about the cellular and tissue response causing catheter obstruction in the treatment of hydrocephalus. **Neurosurg**; 70: 1589-601, 2012.

HAYES, M. et al. The longitudinal association between weight change and health-related quality of life in adults and children: a systematic review. **Obes Rev**, Oct 2017.

HEENEMAN, S.; SLUIMER, J.C.; DAEMEN, M.J.A.P. Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. **Circ. Res**; v. 101, p. 441–454, 2007.

HERMAN, A. G. Differences in structure of angiotensin-converting enzyme inhibitors might predict differences in action. **Am J Cardiol**; v. 70, n. 10, p. 102C-108C, Oct 1992.

HILGENFELDT, U. Angiotensinogen in rat cerebrospinal fluid. **Clin Exp Hypertens A**, v. 6, n. 10-11, p. 1815-24, 1984.

HOCHWALD, G. M. Animal models of hydrocephalus: recent developments. **Proc Soc Exp Biol Med**; v. 178, n. 1, p. 1-11, Jan 1985.

HUANG, X. et al. Dynamic Changes in the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the Beneficial Effects of Renin-Angiotensin-Aldosterone Inhibitors on Spatial Learning and Memory in a Rat Model of Chronic Cerebral Ischemia. **Front Neurosci**, v. 11, p. 359, 2017.

HWANG, Y. S.; SHIM, I.; CHANG, J. W. Anxiety responses and neurochemical changes in a kaolin-induced rat model of hydrocephalus. **J Neurosurg Pediatr**, v. 7, n. 4, p. 401-7, Apr 2011.

INFANGER, D. W.; SHARMA, R. V.; DAVISSON, R. L. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. **Antioxid Redox Signal**, v. 8, n. 9-10, p. 1583-96, 2006 Sep-Oct 2006.

ISHIZAKI, R. et al. Acute and subacute hydrocephalus in a rat neonatal model: correlation with functional injury of neurotransmitter systems. **Pediatr Neurosurg**, v. 33, n. 6, p. 298-305, Dec 2000.

ITO, T. et al. Protection against ischemia and improvement of cerebral blood flow in genetically hypertensive rats by chronic pretreatment with an angiotensin II AT1 antagonist. **Stroke**, v. 33, n. 9, p. 2297-303, Sep 2002.

JONES, H. C.; BUCKNALL, R. M. Inherited prenatal hydrocephalus in the H-Tx rat: a morphological study. **Neuropathol Appl Neurobiol**; v. 14, n. 4, p. 263-74, 1988 Jul-Aug 1988.

KAHLE, K. T. et al. Hydrocephalus in children. **Lancet**; v. 387, n. 10020, p. 788-99, 2016.

KANDALAM, U.; CLARK, M. A. Angiotensin II activates JAK2/STAT3 pathway and induces interleukin-6 production in cultured rat brainstem astrocytes. **Regul Pept**, v. 159, n. 1-3, p. 110-6, Jan 2010.

KAPLAN, A. P.; JOSEPH, K.; SILVERBERG, M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **J Allergy Clin Immunol**; v. 109, n. 2, p. 195-209, Feb 2002

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.

KLIEMANN, S. E.; ROSEMBERG, S. Hidrocefalia derivada na infância: um estudo clínico-epidemiológico de 243 observações consecutivas. **Arq. Neuro-Psiquiatr**; São Paulo , v. 63, n. 2b, p. 494-501, 2005.

KUAN, C. Y. et al. Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. **Trends Neurosci**, v. 23, n. 7, p. 291-7, Jul 2000.

LEEB-LUNDBERG, L. M. et al. XLV International union of pharmacology. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. **Pharmacol Rev**; v. 57, n. 1, p. 27-77, 2005.

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

LOU, M. et al. Sustained blockade of brain AT1 receptors before and after focal cerebral ischemia alleviates neurologic deficits and reduces neuronal injury, apoptosis,

and inflammatory responses in the rat. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 24, n. 5, p. 536-47, May 2004.

LYNCH, K. R.; HAWELU-JOHNSON, C. L.; GUYENET, P. G. Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry. **Brain Res**, v. 388, n. 2, p. 149-58, Jul 1987.

MCALLISTER, J. P.; CHO VAN, P. Neonatal hydrocephalus. Mechanisms and consequences. **Neurosurg Clin N Am**, v. 9, n. 1, p. 73-93, Jan 1998.

MCALLISTER, J. P. Pathophysiology of congenital and neonatal hydrocephalus. **Semin Fetal Neonatal Med**; 17:285-94, 2012.

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

MCKINLEY, M. J. et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, n. 6, p. 901-18, Jun 2003a.

MEHTA, P.K.; GRIENDLING, K.K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol**; v. 292, p. C82–97, 2007.

MICHEL, M. C. et al. A systematic comparison of the properties of clinically used angiotensin II type 1 receptor antagonists. **Pharmacol Rev**, v. 65, n. 2, p. 809-48, Apr 2013a.

MUNOZ, A. et. al. Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. **Neuropharm**; 51: 112–120, 2006.

NAGY, Z.; NARDAI, S. Cerebral ischemia/reperfusion injury: From bench space to bedside. **Brain Res Bull**, v. 134, p. 30-37, Jun 2017.

NAKAGAWA, P.; SIGMUND, C. D. How Is the Brain Renin-Angiotensin System Regulated? **Hypertension**, v. 70, n. 1, p. 10-18, Jul 2017.

NAKAMURA, S. et al. Activation of the brain angiotensin system by in vivo human angiotensin-converting enzyme gene transfer in rats. **Hypertension**, v. 34, n. 2, p. 302-8, Aug 1999.

PHILLIPS, M. I.; DE OLIVEIRA, E. M. Brain renin angiotensin in disease. **J Mol Med (Berl)**, v. 86, n. 6, p. 715-22, Jun 2008.

PORTER, A. J. et al. The angiotensin converting enzyme inhibitor, captopril, prevents the hyperactivity and impulsivity of neurokinin-1 receptor gene 'knockout' mice: sex differences and implications for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 25, n. 4, p. 512-21, Apr 2015.

RAGHAVENDRA, V.; CHOPRA, K.; KULKARNI, S. K. Comparative studies on the memory-enhancing actions of captopril and losartan in mice using inhibitory shock avoidance paradigm. **Neuropeptides**, v. 35, n. 1, p. 65-9, Feb 2001.

REKATE, H. L. A contemporary definition and classification of hydrocephalus. **Semin Pediatr Neurol**; v. 16, n. 1, p. 9-15, 2009.

RIBEIRO, J. M.; FLORÊNCIO, L. P. Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT₁. **Rev Bras Hipertens**; vol 7(3): p. 293-302, 2000.

ROTH, K. A. et al. Epistatic and independent functions of caspase-3 and Bcl-X(L) in developmental programmed cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 1, p. 466-71, Jan 2000.

SAAVEDRA, J. M.; et. al. A centrally acting, anxiolytic angiotensin II AT1 receptor antagonist prevents the isolation stress-induced decrease in cortical CRF1 receptor and benzodiazepine binding. **Neuropsychopharm**; 31: 1123–1134, 2006

SAAVEDRA, J. M.; SÁNCHEZ-LEMUS, E.; BENICKY, J. Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. **Psychoneuroendocrinology**, v. 36, n. 1, p. 1-18, Jan 2011.

SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E. L. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. **Clin Sci**; 112: 375–384, 2007.

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

SHI, L. et al. Effects of intracerebroventricular losartan on angiotensin II-mediated pressor responses and c-fos expression in near-term ovine fetus. **J Comp Neurol**, v. 493, n. 4, p. 571-9, Dec 2005.

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, 2008.

SKOFF, R. P. et al. Plasticity of neurons and glia following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats. **Neurochem Res**, v. 32, n. 2, p. 331-42, Feb 2007.

SMEDA, J. S.; DANESHTALAB, N. The effects of poststroke captopril and losartan treatment on cerebral blood flow autoregulation in SHRsp with hemorrhagic stroke. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 31, n. 2, p. 476-85, Feb 2011.

SONSALLA, P. K. et al. The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril protects nigrostriatal dopamine neurons in animal models of parkinsonism. **Exp neurol**. 250: 376-383, 2013;

TULLY, H. M.; DOBYNS, W. B. Infantile hydrocephalus: a review of epidemiology, classification and causes. **Eur J Med Genet**; v. 57, n. 8, p. 359-68, Aug 2014.

TATEM, K. S.; QUINN, J. L.; PHADKE, A.; YU, Q.; GORDISH-DRESSMAN, H.; NAGARAJU, K. Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. **J. Vis E**, n. 91, p. 1-7, 2014.

VAN EPPS, H. L. Harry Goldblatt and the discovery of renin. **J of Exp Med**; vol. 201, n 9, p 1351, 2005.

VAN THIEL, B. S. et al. Brain Renin-Angiotensin System: Does It Exist? **Hypertension**, v. 69, n. 6, p. 1136-1144, Jun 2017.

VILLAPOL, S.; SAAVEDRA, J. M. Neuroprotective effects of angiotensin receptor blockers. **Am J Hypertens**, v. 28, n. 3, p. 289-99, Mar 2015.

WARF, B. C. et. al. Costs and benefits of neurosurgical intervention for infant hydrocephalus in Sub-Saharan Africa. **J Neurosurg Pediatr**; 8:509-21, 2011.

WARF, B. C. Hydrocephalus in Uganda: the predominance of infectious origin and primary management with endoscopic third ventriculostomy. **J Neurosurg**; 102 (suppl): 1-15, 2005.

WERNER, C. et al. Captopril improves neurologic outcome from incomplete cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v. 22, n. 7, p. 910-4, Jul 1991.

WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. Brain renin-angiotensin--a new look at an old system. **Prog Neurobiol**, v. 95, n. 1, p. 49-67, Sep 2011.

YAMAKAWA H, et. al. Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. **J Cereb Blood Flow Metab** 23:371–380, 2003.

YAMAMOTO, E. et al. Excess salt causes cerebral neuronal apoptosis and inflammation in stroke-prone hypertensive rats through angiotensin II-induced NADPH oxidase activation. **Stroke**, v. 39, n. 11, p. 3049-56, Nov 2008.

YANG, G. et al. The angiotensinogen gene is expressed in both astrocytes and neurons in murine central nervous system. **Brain Res**, v. 817, n. 1-2, p. 123-31, Jan 1999.

YAU, Y. H.; POTENZA, M. N. Stress and eating behaviors. **Minerva Endocrinol**, v. 38, n. 3, p. 255-67, Sep 2013.

ZHOU J, et. al. Angiotensin II AT1 receptor blockade abolishes brain microvascular inflammation and heat shock protein responses in hypertensive rats. **J Cereb Blood Flow Metab** 25:878–886, 2005.