STEPHANYA COVAS DA SILVA

**Análise dos efeitos da oxigenoterapia hiperbárica associada ao tratamento cirúrgico em
lesões cerebrais secundárias à hidrocefalia experimental**

Ribeirão Preto

2021

STEPHANYA COVAS DA SILVA

Análise dos efeitos da oxigenoterapia hiperbárica associada ao tratamento cirúrgico em lesões cerebrais secundárias à hidrocefalia experimental

Versão Original

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

Área de concentração: Morfologia e Medicina Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes.

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação parcial ou total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Silva, Stephanya Covas.

Análise dos efeitos da oxigenoterapia hiperbárica associada ao tratamento cirúrgico em lesões cerebrais secundárias à hidrocefalia experimental /Stephanya Covas da Silva; Orientadora: Luiza da Silva Lopes. – Ribeirão Preto, 2021.

121 f. il.

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

Versão Original

1. Hidrocefalia. 2. Oxigenoterapia hiperbárica. 3. Derivação liquórica. 4. Isquemia encefálica.

SILVA, S.C. Análise dos efeitos da oxigenoterapia hiperbárica associada ao tratamento cirúrgico em lesões cerebrais secundárias à hidrocefalia experimental. 2021. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Ciências– Opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Célia e Donizeti que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Minhas eternas saudades.

AGRADECIMENTOS

À Deus

Pela oportunidade de fazer a pós-graduação em uma universidade tão conceituada, por todos os obstáculos que venci para chegar até aqui, pelos novos amigos que conheci, por todas as coisas novas que pude aprender e por nunca perder a esperança em dias melhores.

À Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes

Por toda confiança que depositou em mim desde meus primeiros dias no laboratório. Pelo apoio, atenção e paciência ao partilhar seus conhecimentos contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual. Ganhei não só uma professora, mas uma grande amiga.

Ao meu noivo Enrique e meus irmãos Eduardo e Giovana

Por todo apoio, todos os momentos de descontração, todos os puxões de orelha, por aguentar meus momentos de estresse. Saibam que sem vocês tudo seria mais difícil.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório

Por todos os dias de convivência, pelas risadas, pelo bom humor, pela troca de experiências. Cada parcela do companheirismo de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Anatomia

Pelo carinho, cuidado e disposição em ajudar sempre que necessário. Eternamente grata.

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

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

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

A todos que auxiliaram na realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

SILVA, S.C. “**Análise dos efeitos da oxigenoterapia hiperbárica associada ao tratamento cirúrgico em lesões cerebrais secundárias à hidrocefalia experimental**”. 2021. 121f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

A hidrocefalia é caracterizada pelo acúmulo de líquido dentro dos ventrículos cerebrais e do espaço subaracnoideo. O volume ventricular pode aumentar progressivamente e gerar graves lesões ao sistema nervoso, tendo a hipóxia/isquemia cerebral como um dos mais importantes fatores envolvidos. A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) tem como principal efeito a melhora do aporte de oxigênio aos tecidos, o que pode diminuir a progressão das lesões secundárias ao aumento ventricular. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a OHB associada à cirurgia de derivação líquórica promove efeitos neuroprotetores para as estruturas lesadas de forma secundária à hidrocefalia e compreender sua atuação. Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar Hannover com sete dias de vida submetidos à hidrocefalia por injeção intracisterna de caulin 15%. Contendo dez animais em cada, seis grupos foram formados: controle, controle associado à terapia hiperbárica, hidrocefálico sem tratamento, hidrocefálico tratado com oxigenoterapia hiperbárica (3 ATA/2h/dia), hidrocefálico tratado com derivação líquórica e hidrocefálico tratado com oxigenoterapia hiperbárica (3 ATA/2h/dia) associada à derivação líquórica. Para avaliação da resposta ao tratamento foram realizados testes de comportamento (campo aberto, labirinto aquático de Morris modificado e reconhecimento de objetos), avaliação por ultrassonografia transcraniana, estudos histológicos (hematoxilina-eosina e luxol *fast blue*), imunoistoquímicos (GFAP, Ki-67, Caspase-3, COX-2, NeuN e SOD1) e bioquímicos para quantificação das proteínas GFAP e MBP através do método ELISA. Os resultados mostram que a associação dos tratamentos exerce efeitos neuroprotetores como a melhora neurocomportamental, preservação das estruturas periventriculares e redução de danos decorrentes da isquemia e do processo inflamatório. Concluímos que a oxigenoterapia hiperbárica possui potencial para ser utilizada como tratamento associado à cirurgia de derivação líquórica na hidrocefalia experimental.

Palavras chave: hidrocefalia, oxigenoterapia hiperbárica, derivação líquórica, isquemia encefálica.

ABSTRACT

SILVA, S.C. “Analysis of the effects of hyperbaric oxygen therapy associated with surgical treatment in brain injuries secondary to experimental hydrocephalus”. 2021. 121f.
Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto – SP, Brazil, 2021.

Hydrocephalus is characterized by the accumulation of CSF inside the cerebral ventricles and the subarachnoid space. Ventricular volume can progressively increase and generate serious damage to the nervous system, with cerebral hypoxia/ischemia as one of the most important factors involved. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) has as its main effect the improvement of oxygen supply to tissues, which can reduce the progression of injuries secondary to ventricular enlargement. This study aimed to evaluate whether HBOT associated with CSF shunt surgery promotes neuroprotective effects for injured structures secondary to hydrocephalus and to understand its role. Seven-day-old male Wistar Hannover rats submitted to hydrocephalus by intracisternal injection of 15% kaolin were used. Containing ten animals in each, six groups were formed: control, control associated with hyperbaric therapy, hydrocephalic without treatment, hydrocephalic treated with hyperbaric oxygen therapy (3 ATA/2h/day), hydrocephalic treated with CSF derivation, and hydrocephalic treated with hyperbaric oxygen therapy (3 ATA/2h/day) associated with CSF derivation. To assess the response to treatment, behavioral tests were performed (open field, modified Morris water maze and object recognition), evaluation by transcranial ultrasonography, histological studies (hematoxylin-eosin and Luxol fast blue), immunohistochemical (GFAP, Ki-67, Caspase-3, COX-2, NeuN, and SOD1) and biochemicals for quantification of GFAP and MBP proteins through the ELISA method. The results show that the combination of treatments exerts neuroprotective effects such as neurobehavioral improvement, preservation of periventricular structures, and reduction of damage resulting from ischemia and the inflammatory process. We conclude that hyperbaric oxygen therapy has the potential to be used as a treatment associated with CSF shunt surgery in experimental hydrocephalus.

KEYWORDS: hydrocephalus, hyperbaric oxygen therapy, CSF shunt, brain ischemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Relação entre a pressão ambiente e o conteúdo arterial de O ₂	25
Figura 2: Física dos gases.....	26
Figura 3: Indução da hidrocefalia.....	35
Figura 4: Câmara hiperbárica experimental.	36
Figura 5: Manômetro.....	37
Figura 6: Ultrassonografia transcraniana: procedimentos e avaliação.....	38
Figura 7: Cirurgia de derivação liquórica ventrículo-subcutânea	40
Figura 8: Teste de campo aberto	41
Figura 9: Water maze	43
Figura 10: Reconhecimento de objetos	44
Figura 11: Gráfico da progressão linear de peso.....	52
Figura 12: Porcentagem do ganho ponderal.....	53
Figura 13: Exploração do campo aberto	54
Figura 14: Gráficos referentes a variáveis analisadas de P6 a P20	54
Figura 15: Water maze: adaptação	55
Figura 16: Water maze: avaliações de P15 a P18 com a plataforma submersa	56
Figura 17: Water maze: progressão linear de P15 a P18.....	57
Figura 18: Water maze: precisão espacial.....	57
Figura 19: Gráficos do teste de reconhecimento de objetos.....	58
Figura 20: Imagens obtidas no exame de ultrassonografia transcraniana.....	60
Figura 21: Gráfico da expansão ventricular	61
Figura 22: Comparação entre animal controle e animal hidrocefálico	61
Figura 23: Fotomicrografias da análise por HE	64
Figura 24: Fotomicrografias do hipocampo e suas alterações	66
Figura 25: Fotomicrografias e gráficos do índice de picnose	67
Figura 26: Espessura do corpo caloso e tonalidade da cor azul	68
Figura 27: Fotomicrografias da tonalidade da cor azul.....	69
Figura 28: GFAP na região do corpo caloso.....	70
Figura 29: GFAP no córtex dorsal ao ventrículo lateral	71
Figura 30: GFAP nas camadas CA1 e giro denteado do hipocampo	73
Figura 31: Fotomicrografias GFAP	74
Figura 32: Ki-67 na matriz germinativa.....	75
Figura 33: Fotomicrografias da MG para Ki-67	76
Figura 34: Gráficos da imunomarcção para caspase-3.....	77
Figura 35: Fotomicrografias da análise de imunomarcção para caspase-3	78
Figura 36: Gráficos referentes à análise por COX-2 em diferentes regiões cerebrais	81
Figura 37: Fotomicrografias da imunomarcção para COX-2.....	82
Figura 38: COX-2 nas subáreas hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e giro denteado.....	83
Figura 39: Imunomarcção pelo anticorpo NeuN em diferentes regiões cerebrais	85
Figura 40: Fotomicrografias da análise por NeuN	86
Figura 41: Fotomicrografias da análise por NeuN nas subáreas hipocâmpais.....	87
Figura 42: Gráficos da análise por SOD1	89
Figura 43: Fotomicrografias referentes a análise por SOD1.....	90
Figura 44: Gráficos da análise bioquímica por ELISA	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANS	Agência Nacional de Saúde Suplementar
ATA	Atmosfera Absoluta
C	Controle
CA	Corno de Amon
CC	Corpo caloso
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COHB	Controle associado à oxigenoterapia hiperbárica
COX-2	Ciclooxigenase-2
CTX	Córtex
DVP	Derivação ventriculoperitoneal
DVS	Derivação ventrículo-subcutânea
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
GFAP	<i>Glial fibrillary acid protein</i>)
GD	Giro denteado
Hb	Hemoglobina
HE	Hematoxilina e Eosina
HNT	Hidrocefálico não tratado
HTD	Hidrocefálico tratado com derivação
HTO	Hidrocefálico tratado com oxigenoterapia hiperbárica
HTOD	Hidrocefálico tratado com oxigenoterapia hiperbárica e derivação
IL	Interleucinas
IP	Intraperitoneal
IP%	Índice de picnose
IR%	Índice de reconhecimento
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LFB	<i>Luxol Fast Blue</i>
MBP	Proteína básica de mielina
MG	Matriz germinativa
NeuN	<i>Neuronal nuclei</i>
ON	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio
OHB	Oxigenoterapia hiperbárica
PBS	Tampão fosfato salina
PBST	Tampão fosfato salina + Triton-X
PtO ₂	Pressão tecidual de oxigênio
SBMH	Sociedade Brasileira de Medicina Hiperbárica
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
UHMS	<i>Undersea & Hyperbaric Medical Society</i>
UST	Ultrassonografia transcraniana
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VL	Ventrículo lateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1. Fisiologia do sistema ventricular	16
2.2. Fisiopatologia da hidrocefalia	17
2.3. Tratamento da hidrocefalia	19
2.4. Hidrocefalia Experimental	21
2.5. Fisiologia do oxigênio e processo isquêmico	22
2.6. Oxigenoterapia hiperbárica	23
2.7. Fisiologia do oxigênio hiperbárico	24
2.8. Gastos de saúde na hidrocefalia e a aplicação da OHB	27
3. JUSTIFICATIVA	30
4. OBJETIVOS.....	32
4.1. Objetivo geral.....	32
4.2. Objetivos específicos	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1. Animais	34
5.2. Indução da hidrocefalia	34
5.3. Câmara hiperbárica experimental	35
5.4. Avaliação por ultrassonografia transcraniana	37
5.5. Derivação liquórica ventrículo-subcutânea.....	39
5.6. Estudos comportamentais	41
5.6.1. Avaliação do peso corporal.....	41
5.6.2. Teste de campo aberto	41
5.6.3. Labirinto aquático de Morris modificado	42
5.6.4. Reconhecimento de objeto	43
5.7. Eutanásia e coleta das amostras	44
5.8. Análises histológicas: HE e LFB	45
5.9. Análises imunoistoquímicas	46
5.9.1. GFAP	46
5.9.2. Ki-67	46
5.9.3. Caspase-3	46
5.9.4. COX-2.....	47
5.9.5. NeuN	47

5.9.6.	SOD1.....	47
5.10.	Quantificação de proteínas totais - <i>Coomassie – Bradford</i>	48
5.11.	Quantificação de proteínas específicas por ELISA: GFAP e MBP	49
5.12.	Documentação fotográfica	50
5.13.	Análise estatística.....	50
6.	RESULTADOS	52
6.1.	Avaliação do peso corporal.....	52
6.2.	Avaliação em campo aberto (<i>open field</i>)	53
6.3.	Avaliação pelo labirinto aquático de Morris modificado.....	55
6.4.	Avaliação por reconhecimento de objeto	58
6.5.	Ultrassonografia transcraniana.....	59
6.6.	Análise histológica por hematoxilina-eosina	62
6.6.1.	Corpo caloso	62
6.6.2.	Córtex dorsal ao ventrículo lateral	62
6.6.3.	Matriz germinativa.....	63
6.6.4.	Hipocampo.....	63
6.7.	Análise histológica por <i>luxol fast blue</i> no corpo caloso.....	68
6.8.	Análises imunoistoquímicas	70
6.8.1.	GFAP	70
6.8.2.	Ki-67	75
6.8.3.	Caspase-3	77
6.8.4.	COX-2.....	79
6.8.5.	NeuN	84
6.8.6.	SOD1.....	88
6.9.	Análise bioquímica por ELISA: GFAP e MBP	91
7.	DISCUSSÃO	92
8.	CONCLUSÕES	105
9.	REFERÊNCIAS	107

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A hidrocefalia é caracterizada pelo excesso de líquido cefalorraquidiano (LCR) nos ventrículos cerebrais e no espaço subaracnoideo (VERKMAN *et al.*, 2017). Esta condição está associada ao desequilíbrio entre a produção, circulação e a absorção do LCR (LEINONEN; VANNINEN; RAURAMAA, 2017). Tal distúrbio leva ao aumento da pressão intracraniana, ventriculomegalia, lesões secundárias do parênquima cerebral e a graves danos neurológicos (LU *et al.* 2019; MEDINA *et al.*, 2017). Conforme o aumento do tamanho ventricular, tecidos e vasos sanguíneos são estirados e/ou comprimidos. Em consequência, o fluxo sanguíneo é reduzido e condições de hipóxia e isquemia cerebral são observadas (LOPES; SLOBODIAN; DEL BIGIO, 2009). Neste cenário, as vias metabólicas dependentes de oxigênio (O₂), um substrato essencial para o organismo, limitam o fornecimento de nutrientes e removem insuficientemente os metabólitos celulares, o que pode levar a sérios danos ao Sistema Nervoso Central (SNC), como a redução da atividade mental, prejuízos cognitivos, neurotoxicidade e, até mesmo, a morte celular (OHTAKI *et al.*, 2005).

A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) promove a oferta de 100% de O₂ em um meio de alta pressão. Neste ambiente, o O₂ se dissolve mais facilmente no plasma sanguíneo e atinge áreas que não estavam sendo devidamente irrigadas (STĘPIEŃ; OSTROWSKI; MATYJA, 2016). Por este motivo, vem sendo utilizada em inúmeras condições neurológicas relacionadas à hipóxia e a isquemia (AGHAJAN *et al.*, 2019; CUI *et al.*, 2017; MCMONNIES, 2018).

O tratamento usual da hidrocefalia consiste em restaurar a dinâmica liquórica através de sistemas de drenagem que direcionam o LCR em excesso dos ventrículos cerebrais para outras cavidades corporais e uma das técnicas mais utilizadas é a derivação ventriculoperitoneal (DVP) (JONES; HUSSAIN; LEACH, 2015; THIONG'O; LUZZIO; ALBRIGHT, 2015). A decisão do momento ideal para a intervenção cirúrgica varia de acordo com as condições clínicas de cada paciente. Enquanto não realizada, o tamanho ventricular pode aumentar gradativamente e levar a progressivos danos neurológicos. Por este motivo, busca-se novas drogas e terapias que possam amenizar os danos causados pela ventriculomegalia até o momento em que a cirurgia possa ser realizada.

A OHB já se mostrou benéfica na hidrocefalia experimental ao reduzir a astrogliose reativa e melhorar a performance dos animais em testes comportamentais em um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (DA SILVA *et al.*, 2018). No presente estudo, observamos se a OHB se manteve benéfica mesmo quando associada ao tratamento cirúrgico e tentamos compreender alguns dos principais mecanismos de ação envolvidos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Fisiologia do sistema ventricular

O sistema ventricular compreende um conjunto de estruturas denominadas ventrículos cerebrais, os quais contêm LCR no interior de suas cavidades. O LCR é um fluido aquoso e incolor que contém 99% de água e 1% é dividido em eletrólitos, proteínas, aminoácidos, glicose, entre outros e também é encontrado no espaço subaracnoideo (HLADKY; BARRAND, 2014). Dentre suas mais variadas funções, inclui-se fornecer amortecimento para as estruturas do SNC, prover uma via para nutrientes e hormônios durante o desenvolvimento normal do cérebro e auxílio na remoção de resíduos, mantendo a homeostase (KAUR *et al.*, 2021). Em resumo, representa um papel de extrema importância em aspectos estruturais, hidrodinâmicos, metabólicos e imunológicos (TUMANI; HUSS; BACHHUBER, 2017).

O LCR é secretado como um ultrafiltrado modificado do sangue por grupos de células endoteliais, encontradas no cérebro e na medula espinhal, e concentradas nos plexos coróides situados nos ventrículos cerebrais (JOHANSON *et al.*, 2008; OSHIO *et al.*, 2005; TUMANI; HUSS; BACHHUBER, 2017; WOLBURG; PAULUS, 2010). A partir dos ventrículos laterais, o LCR é direcionado para o terceiro ventrículo através do forame interventricular, também chamado de forame de *Monro*. Em seguida, flui através do aqueduto do mesencéfalo e chega até o quarto ventrículo. Por fim, o LCR atravessa os forames laterais (de *Luschka*) e medial (*Magendie*) e alcança o espaço subaracnoideo. Após circular pelos hemisférios cerebrais e medula espinhal, o LCR é reabsorvido pelas vilosidades aracnoideas e drenado para a corrente sanguínea (KOUSI; KATSANIS, 2016). Em indivíduos adultos, a produção de LCR é de aproximadamente 430-530 ml por dia, uma taxa estimada em cerca de 0,3-0,4 ml/min, de 18-25ml/hora (KHASAWNEH; GARLING; HARRIS, 2018). O fluxo liquórico é unidirecional e pulsátil devido ao fluxo cardíaco (hemodinâmica arterial no plexo coróide) e a respiração pulmonar. Além disso, estudos apontam que o fluxo de LCR no cérebro humano também está relacionado com as ondas lentas da atividade neural e as flutuações hemodinâmicas durante o sono, conferindo uma ampla relação com o ciclo circadiano (ABBOTT *et al.*, 2018; FULTZ *et al.*, 2019; KAUR *et al.*, 2021).

2.2. Fisiopatologia da hidrocefalia

A hidrocefalia é um dos acometimentos mais comuns do SNC durante o período neonatal e a infância. É definida como um desequilíbrio entre a produção, circulação e absorção do LCR, que resulta na interrupção da dinâmica normal do fluxo liquórico, e é frequentemente caracterizada por um aumento na pressão intracraniana, resultando em uma dilatação anormal dos ventrículos cerebrais (LEINONEN; VANNINEN; RAURAMAA, 2017; PATEL; TARI; MANGANO, 2021). Durante os séculos XVIII e XIX várias pesquisas foram feitas para entender a fisiopatologia da hidrocefalia. Nomes como Dandy, Blackfan, Bering, Milhorat, Defeo e outros, trouxeram contribuições importantes para esta área da neurociência como, por exemplo, a criação do primeiro modelo de hidrocefalia experimental em cães, feito por Walter Dandy e Kenneth Blackfan no ano de 1913. O modelo consistia na colocação de um pequeno pedaço de algodão no aqueduto do mesencéfalo que bloqueava a circulação liquórica. Clark e Milhorat, em 1970, testaram um modelo de hidrocefalia experimental em macacos que consistia na introdução de um cateter pelo quarto ventrículo até o aqueduto do mesencéfalo onde um balão era insuflado e bloqueava a passagem do LCR. A partir destas pesquisas, a hidrocefalia vem sendo estudada e discutida até os dias atuais (BERING; SATO, 1963; CLARK; MILHORAT, 1970; DANDY, 1919; DEFEO *et al.*, 1979; INGRAHAM; ALEXANDER; MATSON, 1947; THOMAS, 1914; WATTERS *et al.*, 1969).

A hidrocefalia atinge várias faixas etárias e possui características clínicas diversas, etiologias específicas, respostas diferentes aos tratamentos e prognóstico variável nas várias fases da vida. Trata-se de uma condição complexa com múltiplas etiologias e com diferentes mecanismos patogénéticos. A realidade é que a hidrocefalia continua sendo um grande desafio para a neurocirurgia pediátrica (DI ROCCO; FRASSANITO, 2019). A incidência de hidrocefalia é estimada em 1:2000 nascidos vivos e está associada a cerca de um terço de todas as malformações congênitas do SNC (BONDURANT; JIMENEZ, 1995; LAM *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2019). No Brasil, é a desordem neurológica mais frequente e compreende 12% de todas as malformações graves encontradas por ocasião do parto (PASSINI; *et al.*, 1998).

Em relação ao diagnóstico, a idade pode ser um indicativo para as mais diversas causas de hidrocefalia. Fetos e recém-nascidos podem apresentar hidrocefalia devido à hemorragia intraventricular ou por causas genéticas. Bebês são mais propensos à hidrocefalia secundária a malformações congênitas, como a estenose do aqueduto ou a malformação de Chiari. Em crianças mais velhas, pode ser idiopática ou adquirida, sendo os tumores a causa mais frequente (CORNS; MARTIN, 2012). Já em idosos, a hidrocefalia pode ser adquirida pós hemorragia

subaracnoidea, traumas, infecções, tumores, inflamações ou complicações pós-operatórias. Nesta faixa etária, a nomenclatura mais utilizada é hidrocefalia de pressão normal (OI, 2011).

A hidrocefalia pode ser classificada em comunicante ou obstrutiva, e a distinção entre as duas se dá a partir da dinâmica do fluxo liquórico. Na hidrocefalia comunicante, o LCR flui livremente pelo sistema ventricular, mas pode ficar aprisionado no espaço subaracnoideo, por exemplo, pela má absorção das vilosidades aracnoideas. Já na hidrocefalia obstrutiva, o LCR é bloqueado dentro do sistema ventricular, tendo como principais causas: tumores, estenose do aqueduto, inflamações, entre outras (DANDY, 1919; KOUSI; KATSANIS, 2016; OI, 2011).

As manifestações clínicas irão depender da idade do paciente e da progressão da hidrocefalia. Antes do fechamento das suturas cranianas é possível identificar macrocefalia, “olhar do sol poente”, veias do couro cabeludo distendidas, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e dificuldades na alimentação (CORNIS; MARTIN, 2012). Com as suturas fechadas, os sintomas mais encontrados são: dores de cabeça, vômitos, sonolência, comprometimento cognitivo, visão borrada, irritabilidade, letargia, entre outros (DI ROCCO; FRASSANITO, 2019). Distúrbios endocrinológicos também podem ser observados, como a hipofunção ou hiperfunção da pituitária (BORENSTEIN-LEVIN *et al.*, 2014). Em ensaios histológicos é visível a compressão/estiramento do epêndima, epitélio que reveste a superfície ventricular interna (KIEFER *et al.*, 1998). Observa-se também a destruição de axônios periventriculares, acúmulo de resíduos metabólicos no LCR (KHAN *et al.*, 2006; LOPES; SLOBODIAN; DEL BIGIO, 2009), proliferação astrocitária e microglial, perda de conexões axonais e desmielinização (DEL BIGIO, 2010). Na matriz germinativa, pode ocorrer diminuição da população celular e redução/perda da sua capacidade de replicação, com prejuízo do desenvolvimento neural (DA SILVA *et al.*, 2018). Há vasoconstrição e distorção de artérias e veias encefálicas, com consequente redução do fluxo sanguíneo e do aporte de O₂ aos tecidos locais, o que dispara o início do processo isquêmico.

2.3. Tratamento da hidrocefalia

O tratamento da hidrocefalia envolve condutas invasivas e não invasivas. As condutas não invasivas incluem a utilização de drogas como a acetazolamida, um inibidor da anidrase carbônica e a furosemida, um agente diurético com atuação nos túbulos renais, que visam diminuir a produção líquórica. Entretanto, é controversa a eficácia do uso destes medicamentos. Del Bigio e Di Curzio (2016) apontaram, em sua revisão, diversos outros estudos que viram que tais drogas não mostraram grandes benefícios e ainda comentam a dificuldade em evitar a toxicidade em tratamentos não cirúrgicos.

Dentre as condutas invasivas, a primeira referência histórica de uma derivação líquórica é atribuída a Le Cat no ano de 1744. Na antiguidade, as cirurgias para casos de hidrocefalia baseavam-se no conceito equivocado que o LCR era localizado em uma coleção extra cerebral. Os primeiros tratamentos foram feitos a partir de punções ventriculares e um dreno era deixado no local por um determinado tempo. Infelizmente, a maioria das punções causavam a morte dos pacientes (HAYNES, 1913). A drenagem líquórica dos ventrículos cerebrais para outras cavidades corporais de baixa pressão começou a ser descrita a partir de 1920. Vários locais foram testados como: a fossa infra temporal, os seios aéreos dos mastoides, cavidade pleural, tubas uterinas, entre vários outros, porém, tais técnicas não obtiveram sucesso (GIROTTI; SINGH; RODGERS, 2009). Um dos primeiros autores a utilizarem a cavidade peritonial para a absorção de LCR foi Kausch, em 1905, que utilizou um tubo de látex para fazer uma DVP, porém, o paciente sobreviveu apenas algumas horas (KAUSCH, 1908). Em 1910, Hartwell utilizou fios de prata como um pavio para realizar a DVP e a criança operada sobreviveu por dois anos (DAVIDSON, 1976). A era moderna nos tratamentos para hidrocefalia foi iniciada por Torkildsen que, em 1939, descreveu a derivação dos ventrículos laterais para a cisterna magna (MASET *et al.*, 2009; TORKILDSEN, 1939) e, com a evolução das técnicas, um sistema de drenagem com circuito fechado e regulado por pressão foi criado por Ingraham, em 1941 (INGRAHAM; CAMPBELL, 1941; LIMA, 2014).

Foi na década de 50 que surgiram as primeiras válvulas unidirecionais com sistema de anti-refluxo. Matson introduziu a derivação líquórica ventrículo-ureteral em crianças pós-nefrectomia (MATSON, 1949) e Nulsen e Spitz inventaram o modelo de derivação ventrículo-jugular, em que o cateter era encaminhado até a veia cava superior e então drenado normalmente pela corrente sanguínea. A criança foi observada por dois anos e meio e a eficácia do método foi confirmada (NULSEN; SPITZ, 1951).

A grande mudança na história dos sistemas valvulados surgiu com John W. Holter, um fabricante de ferramentas cujo filho nasceu com hidrocefalia associada à mielomeningocele. O filho de Holter estava sendo cuidado na Filadélfia, o mesmo local onde os cirurgiões supracitados Nulsen e Spitz trabalhavam. Ao mencionarem a necessidade de uma válvula barata que controlasse o fluxo liquórico e a pressão intracraniana, Holter descobriu, após algumas tentativas, que poderia usar uma válvula unidirecional de silicone. Mediante a isto, Holter construiu uma válvula de fenda de silastic (silicone elástico) implantada por Spitz em 1956. O silastic foi biocompatível e resistente a traumas mecânicos e a técnica foi tão eficaz que seu conceito se mantém até hoje na produção das mais modernas válvulas para hidrocefalia. John Holter abriu a empresa Holter-Hausner International que fabrica as válvulas de derivação. Apesar de não ter conseguido salvar seu filho, a válvula Spitz-Holter, assim nomeada, vem ajudando milhares de pacientes por todo o mundo (BOOCKVAR; LOUDON; SUTTON, 2001).

A técnica cirúrgica mais amplamente utilizada para tratamento da hidrocefalia é a DVP, que consiste em desviar o LCR dos ventrículos laterais para a cavidade peritonial através de uma válvula unidirecional. O LCR também pode ser direcionado para o átrio cardíaco direito, através da derivação ventriculoatrial e pela terceiroventriculostomia endoscópica, que ao perfurar o assoalho do terceiro ventrículo, permite que o LCR flua diretamente para o espaço subaracnoideo e seja absorvido pelas vilosidades aracnoideas. É necessário ressaltar que as cirurgias de derivação estão sujeitas a várias complicações, dentre elas, as mais frequentes são infecções ou má colocação da válvula. A taxa de mau funcionamento na DVP, por exemplo, no primeiro ano de implantação, foi relatada recentemente como alta, em torno de 11-25% (WONG *et al.*, 2021). Tais complicações são mais incidentes na população pediátrica, em especial, em neonatos (LIMA, 2014). Em 1992, o neurocirurgião francês Maurice Choux publicou um protocolo para otimização da cirurgia de DVP, amplamente aceito nos dias atuais (CHOUX; CAMBOULIVES; RIGAUT, 1992). Atualmente, vários modelos e marcas de válvulas encontram-se disponíveis no mercado para o tratamento da hidrocefalia. Entretanto, os dispositivos modernos são caros e ainda susceptíveis a complicações.

Uma grande preocupação vivenciada pelos neurocirurgiões é o momento exato para a realização da cirurgia. Existem pacientes que, mesmo tendo necessidade imediata de tratamento cirúrgico, podem apresentar condições clínicas desfavoráveis, adiando a cirurgia. Pensando nestas intercorrências, pesquisas são feitas com a finalidade de proteger o SNC. Vários testes com procedimentos e/ou fármacos são realizados diariamente com a premissa de tentar reduzir os danos causados pela hidrocefalia, mesmo que haja, futuramente, a indicação definitiva para a colocação de sistemas valvulados.

2.4. Hidrocefalia Experimental

A indução experimental de hidrocefalia para fins de pesquisa vem sendo praticada há várias décadas. Os primeiros relatos são atribuídos a Burr e McCarthy, em 1900, que injetaram diversas soluções irritantes nos ventrículos cerebrais de gatos filhotes (INGRAHAM; ALEXANDER; MATSON, 1947). Anos depois, em 1913, Walter Dandy e Kenneth Blackfan criaram o primeiro modelo de hidrocefalia experimental em cães (DANDY, 1919). Em 1914, Thomas produziu um modelo de hidrocefalia obstrutiva em cães após induzir processo inflamatório no aqueduto do mesencéfalo, que impedia a passagem do LCR (THOMAS, 1914). Daí em diante as tentativas de reproduzirem um modelo fiel à hidrocefalia clínica não cessaram.

Finalmente, no ano de 1932, Dixon e Heller testaram a injeção intracisternal de caulim para produção da hidrocefalia. Trata-se de um composto de silicato hidratado de alumínio, simples, barato e de fácil acesso, eficiente no bloqueio da circulação liquórica sem a necessidade de procedimentos cirúrgicos associados. O caulim não gera modificações anatômicas indesejáveis que possam produzir distorções do tecido nervoso que não aquelas resultantes exclusivamente da hidrocefalia. Quando injetado na cisterna magna, um processo inflamatório agudo inicia-se nas meninges, obstrui a saída do quarto ventrículo e não causa lesões diretas ao parênquima cerebral (DEFEO *et al.*, 1979). Assim, o caulim vem sendo considerado atualmente como o método mais fidedigno e mais utilizado para a produção da hidrocefalia experimental.

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando incessantemente há mais de 10 anos no estudo de diversas drogas e procedimentos que possam oferecer efeitos neuroprotetores na hidrocefalia experimental induzida por caulim (CATALÃO *et al.*, 2014; CATALÃO *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2018; GARCIA *et al.*, 2017; SAMPAIO *et al.*, 2019; TIDA *et al.*, 2018), no mapeamento de lesões secundárias à ventriculomegalia (AISENGART *et al.*, 2011; CATALÃO *et al.*, 2019; DEL BIGIO *et al.*, 2012; LOPES; SLOBODIAN; DEL BIGIO, 2009; LOPES; MACHADO; LACHAT, 2003; TAVEIRA *et al.*, 2012), em ensaios sobre o curso do tratamento cirúrgico experimental (ROCHA CATALÃO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2019) e, também, na análise de exames de imagem complementares que delimitam a melhor visualização das estruturas cerebrais e auxiliam no diagnóstico da hidrocefalia experimental (CASTRO *et al.*, 2012; DE MOURA SILVA *et al.*, 2021; LUCCAS; SAMPAIO *et al.*, 2015). Além destes, podemos incluir nesta lista estudos em fase de preparação/publicação utilizando drogas como o Resveratrol, a Memantina, Canabidiol, Celecoxibe, entre outros.

2.5. Fisiologia do oxigênio e processo isquêmico

O O_2 é um substrato essencial para a sobrevivência, pois desempenha um papel fundamental nos principais processos biológicos e fisiológicos do organismo vivo. É transportado para os tecidos a partir de sua associação com a hemoglobina (Hb). A Hb completamente saturada, possui capacidade máxima de transporte em cerca de 20,3 a 20,7 ml de O_2 para cada 100 ml de sangue em condições normais (BRUGNIAUX *et al.*, 2018; FINCH; LENFANT, 1972). A pressão tecidual de oxigênio (PtO_2) fisiológica é de 35 a 40 mmHg, nível relativamente baixo (cerca 40% a 45% da PtO_2 do sangue arterial). Em condições de edema, traumas ou isquemia, nem mesmo esse nível relativamente baixo é atingido, resultando em hipóxia localizada independentemente das condições de oxigenação do restante do organismo. Esta hipóxia local impede o desenvolvimento dos mecanismos de restauração tecidual e as defesas anti-infecciosas tornam-se insuficientes, causando uma ampla gama de danos ao tecido, incluindo morte celular, processos inflamatórios induzidos e função mitocondrial prejudicada (FISCHER; BARAK, 2020).

A isquemia cerebral é a perda do suprimento sanguíneo por redução do fluxo arterial, o que diminui a oferta de O_2 e demais substratos metabólicos aos tecidos. O processo isquêmico está intimamente ligado às lesões teciduais encontradas na hidrocefalia devido à compressão e ao estiramento dos vasos cerebrais. Em condições de depleção de O_2 , as vias metabólicas O_2 -dependentes tornam-se ineficazes e limitam o fornecimento de nutrientes e a remoção adequada de metabólitos celulares. A redução do fluxo sanguíneo cerebral em 20% a 30% abaixo dos valores fisiológicos já é suficiente para iniciar esses eventos (OHTAKI *et al.*, 2005).

O bloqueio do fluxo sanguíneo, dependendo do tempo, da intensidade, da velocidade de instalação, da natureza do órgão e da temperatura, poderá determinar os mais variados graus de lesão celular. Em um meio hipóxico/isquêmico, as reservas energéticas se esgotam e aumenta-se a excitotoxicidade tecidual. Há também a ativação de enzimas que alteram a função celular e desestabilizam a estrutura da membrana plasmática (JHA *et al.*, 2018; OHTAKI *et al.*, 2005). Devido aos efeitos citotóxicos, há um progressivo aumento do estresse oxidativo, o que leva as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) a enfraquecerem a vasculatura local e criarem desequilíbrios iônicos, levando mais água para o espaço intracelular e resultando em edema (LISKA *et al.*, 2018; STOKUM; GERZANICH; SIMARD, 2016). Todos os exemplos supracitados são suficientes para desencadear a interrupção da homeostase celular cerebral e induzir uma cascata de eventos que levam à morte do tecido em questão.

2.6. Oxigenoterapia hiperbárica

A OHB é um método terapêutico adjuvante empregado em patologias infecciosas, inflamatórias e isquêmicas há mais de 50 anos. Consiste na administração de O₂ puro (fração inspirada de O₂ (FiO₂) = 100%) em ambiente pressurizado acima da pressão atmosférica ao nível do mar (D'AGOSTINO; PUTNAM; DEAN, 2007). O tratamento é realizado dentro de um cilindro rígido, a câmara hiperbárica. Em humanos, o tratamento é realizado em câmaras *multiplaces* (que acomodam vários pacientes simultaneamente) ou *monoplaces* (que acomoda apenas um paciente). As câmaras *monoplaces* são pressurizadas com O₂ puro e o paciente o respira diretamente do ambiente interno da câmara e as *multiplaces* comportam duas ou mais pessoas (pacientes, observadores e/ou pessoal de suporte) e são pressurizadas com ar comprimido enquanto os pacientes respiram O₂ puro através de máscaras (THOM, 2011). A prática da OHB está regulamentada no Brasil pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) desde 1995 e foi amplamente divulgado a partir da Unidade de Terapia Intensiva da disciplina de Cirurgia do Trauma do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, iniciada em 1992. Foi o primeiro serviço de câmara *monoplace* da América Latina e o maior divulgador do método terapêutico (D'AGOSTINO *et al.* 2008). Atualmente conta com mais de 150 serviços no Brasil em todos os estados e capitais.

Disposto nas Diretrizes de Utilização da Oxigenoterapia Hiperbárica, Res. CFM Nº 1457/95, as aplicações clínicas atualmente reconhecidas da OHB são: embolias gasosas, doença descompressiva, embolias traumáticas pelo ar, envenenamento por monóxido de carbono ou inalação de fumaça, envenenamento por cianeto ou derivados cianídricos, gangrena gasosa, síndrome de Fournier, infecções necrotizantes de tecidos moles, isquemias agudas traumáticas, vasculites agudas, queimaduras térmicas e elétricas, úlceras de pele, lesões de pé diabético, escaras de decúbito, lesões por radiação, retalhos ou enxertos comprometidos, osteomielites e anemia aguda na impossibilidade de transfusão sanguínea (HENRY; RECH, 2019).

Além destas condições já pré-estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Medicina Hiperbárica (SBMH) e pela *Undersea & Hyperbaric Medical Society* (UHMS) diversos outros estudos já observaram efeitos positivos da OHB nas mais variadas afecções neurológicas, como no autismo (PODGÓRSKA-BEDNARZ; PERENC, 2021), traumas cranioencefálicos (GONZALES-PORTILLO *et al.*, 2019; HUANG; OBENAU, 2011; LIU *et al.*, 2015) gliomas (XUE *et al.*, 2021), no Alzheimer (SOMAA, 2021), no estresse pós-traumático (SHYTLE *et al.*, 2019), em acidentes vasculares (HADANNY *et al.*, 2020; ZHAI *et al.*, 2016), entre várias outras condições, o que nos levou a hipotetizar seus efeitos também na hidrocefalia obstrutiva.

2.7. Fisiologia do oxigênio hiperbárico

Grande parte do O_2 utilizado pelo organismo é transportado pela Hb e uma quantidade desprezível é dissolvida no plasma sanguíneo. Com a Hb saturada de O_2 (100%), o efeito da OHB consiste em elevar progressivamente a concentração de O_2 do plasma. A três atmosferas absolutas (ATA), a quantidade de O_2 dissolvido no plasma pode atingir até 6% do volume, o que corresponde ao consumo total de O_2 em condições normais (fig. 1). O efeito mais importante do tratamento com OHB é a hiperoxigenação tecidual (aumento da PtO_2) a partir do O_2 dissolvido no plasma. Ao ser suspensa a aplicação da OHB, a pressão de O_2 do sangue cai abruptamente, porém, dependendo do tecido, a PtO_2 permanece elevada por horas. A alternância entre hiperóxia e hipóxia é reconhecida como uma potente estratégia para estimular a neovascularização (MARX *et al.*, 1990).

A OHB baseia-se em quatro leis da física dos gases do mergulho, que são: lei de Boyle-Mariotti, lei de Charles, lei de Dalton e lei de Henry. A lei de Boyle-Mariotti diz que se a temperatura permanecer constante, o volume de gás varia inversamente com a pressão absoluta do sistema (fig. 2A). Isso quer dizer que à medida que a pressão aumenta no interior da câmara, diminui-se o volume aéreo nas cavidades corporais. É por este motivo que a pressurização e a despressurização da câmara precisam ser feitas vagarosamente, afim de se evitar efeitos colaterais. A lei de Charles menciona que o volume de um gás a uma pressão constante é diretamente proporcional à temperatura. Durante uma sessão de OHB, a compressão é lenta e gera um aquecimento facilmente tolerável (fig. 2B). Na descompressão, observa-se o oposto, há diminuição na temperatura. Já a lei de Dalton estabelece que em uma mistura gasosa, a soma das pressões parciais dos gases é igual à pressão total do sistema. Exemplo: em relação ao ar atmosférico, a pressão parcial de O_2 é de 160 mmHg e do nitrogênio 600 mmHg ao nível do mar. A soma das duas pressões é igual a 760 mmHg que se refere a pressão atmosférica normal. Na medida em que a pressão se eleva, aumentam-se também as pressões parciais dos gases presentes na câmara. Por fim, a lei de Henry diz que a quantidade de gás que se dissolve num meio líquido a uma determinada temperatura é diretamente proporcional à pressão do gás sobre o líquido (fig. 2C). Como já mencionado, à níveis hiperbáricos (de duas a três ATA) o O_2 é gradativamente dissolvido no plasma. Ou seja, em condições hiperbáricas, o O_2 se dissolve em maior quantidade no meio sanguíneo (pode chegar até 1900% da quantidade de O_2 total em nosso organismo) e, assim, atinge estruturas que em condições pressóricas normais, não estavam sendo devidamente oxigenadas (EDWARDS, 2010; GARCÍA-COVARRUBIAS; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, 2000).

Figura 1 - Relação pressão ambiente/conteúdo arterial de O₂

Figura 1: Relação entre a pressão ambiente e o conteúdo arterial de O₂. O oxigênio ligado à hemoglobina consegue atingir o plasma sanguíneo em maior quantidade conforme o aumento da pressão atmosférica imposta. A três ATA o conteúdo de O₂ dissolvido no sangue é maior do que toda a quantidade de O₂ presente no organismo em condições pressóricas normais.

Fonte: imagem gentilmente cedida pelos professores Omar Feres e Marisa D'Agostino.

Vários efeitos terapêuticos do oxigênio hiperbárico já foram descritos. A OHB restaura a defesa orgânica e aumenta a capacidade de fagocitose dos neutrófilos sob algumas bactérias (MADER *et al.*, 1980), estimula a formação da matriz de colágeno, essencial para a angiogênese e para a cicatrização tecidual (PROCKOP *et al.*, 1979) e fornece estímulo à resposta inflamatória e antibacteriana natural. A terapia hiperbárica também já mostrou inibir o processo de apoptose celular por proteínas reguladoras (LIU *et al.*, 2013; PENG *et al.*, 2009), reduzir a liberação de mediadores inflamatórios, como as interleucinas (IL) IL1, IL6, IL8 e IL10 e o fator de necrose tumoral (CHEN *et al.*, 2014). Apesar de todos estes efeitos, sempre houve a suspeita de que o O₂ hiperbárico poderia exacerbar a formação de ERO's. Ao contrário desta suspeita, a OHB melhora a atuação dos “varredores” dos radicais livres como a superóxido dismutase (SOD) e o óxido nítrico (ON) (BURAS, 2000; YASAR *et al.*, 2003), e também atua através de seu efeito anti-adesão de neutrófilos na parede dos vasos, bloqueando o fenômeno em sua fase inicial (BURAS, 2000; BURAS; REENSTRA, 2007). Em resumo, o tratamento com a OHB pode atenuar o processo isquêmico, a ação dos radicais livres, diminuir os níveis de estresse oxidativo, preservar a integridade mitocondrial, acelerar o metabolismo e reduzir a morte celular (BOUSSI-GROSS *et al.*, 2013; HUANG; OBENAU, 2011). No tecido nervoso, foi observada a redução da morte neuronal, a aceleração da recuperação neural pós-lesão (CHANG *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2008) entre outras.

Figura 2 – Física dos Gases

A) Lei de Boyle-Mariotti

B) Lei de Charles

C) Lei de Henry

Figura 2: Física dos gases. **A) Lei de Boyle-Mariotti:** Em temperatura constante e em ambiente normobárico, o volume de gás permanece constante, porém, quando se aumenta a pressão do ambiente, o volume do gás diminui.; **B) Lei de Charles:** ao elevar a temperatura do ambiente, o volume do gás é aumentado dentro do sistema e quando a temperatura abaixa, o volume de gás se reduz consequentemente. **C) Lei de Henry:** a diluição de um gás em um meio aquoso é maior conforme o aumento da pressão exercida sobre o líquido.

Fonte: imagem gentilmente cedida pelos professores Omar Feres e Marisa D'Agostino.

2.8. Gastos de saúde com o tratamento da hidrocefalia e a aplicação da OHB

Apesar dos avanços tecnológicos na implantação das válvulas de drenagem para o tratamento da hidrocefalia, é sabido que a porcentagem de complicações e revisões ainda é muito alta e muitos pacientes precisam ser submetidos a várias outras cirurgias ao longo da vida (MORAN *et al.*, 2015). Um estudo transversal foi desenvolvido para avaliar o impacto dos dispositivos de derivação na qualidade de vida dos pacientes e observaram que em 81% dos casos foi necessária pelo menos uma revisão de shunt, com uma média relatada de 10 cirurgias de revisão de shunt por paciente (1-200 cirurgias). Oclusão, migração de shunt e infecção foram as principais causas de revisão em 60%, 47% e 35%, respectivamente. Além disso, 72% dos pacientes relataram dor e desconforto com o dispositivo e 68% expressaram evitar certas atividades devido ao "medo de colidir com o shunt" (MITCHELL *et al.*, 2021). Tudo isso implica diretamente nos custos com esses tratamentos e gera um impacto no sistema de saúde e na vida do paciente.

Em uma busca pela plataforma DataSUS foram encontrados alguns dados sobre o tratamento cirúrgico da hidrocefalia. Somente no estado de São Paulo, no período de 2014 a 2019, o número de dias de permanência em internação para tratamento de complicações relacionadas com a hidrocefalia permaneceu em torno de 573,13 dias/ano. São em média 47,89 novas internações/ano. Neste período, o número de óbitos registrados na plataforma foi de 2,10 mortes/ano. No geral, a taxa de mortalidade ficou em média 4,73 mortes/ano. E quando se fala de custos, o sistema de saúde gasta em torno de R\$ 112.839,36 reais/ano com tratamentos na hidrocefalia e uma média de R\$ 15.451,60 reais é o valor pago com os serviços da equipe multiprofissional a cada ano.

Já quando falamos do tratamento com oxigenoterapia hiperbárica, é esperado uma redução de custos através da diminuição da necessidade de cirurgias, antibióticos e curativos e também a necessidade e o tempo de tratamento e internação. Nas áreas em que o serviço já é implementado e regulamentado nas Diretrizes de Utilização da OHB pela Sociedade Brasileira de Medicina Hiperbárica, como no tratamento de queimados, por exemplo, um levantamento realizado em pacientes internados na Santa Casa de Misericórdia de Campo Grande pôde observar uma economia financeira em cerca de 16% nos custos hospitalares e abreviação do tempo médio de internação em seis dias, gerando uma economia média por paciente de R\$ 4.337,78 (FILHO *et al.*, 2014).

O que queremos hipotetizar nesse tópico é que, baseado nos resultados positivos e neuroprotetores que já foram relatados na literatura para o tratamento de diversas afecções

neurológicas, será que poderíamos ter uma perspectiva favorável também no tratamento coadjuvante na hidrocefalia? Levando em consideração os R\$ 112.839,36 reais gastos por ano com o tratamento da hidrocefalia apenas no estado de São Paulo, e sabendo que, em média, uma sessão de duas horas de OHB pode custar em torno de R\$ 277,00 a R\$ 500,00 reais, em 20 sessões teremos um valor médio de aproximadamente R\$ 10,000,00 reais. Neste ponto, é válido salientar a obrigatoriedade de os planos privados de saúde cobrirem o procedimento já implementado no ROL da Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) desde 2010, e que no estado de São Paulo, em média 50% da população possui plano de saúde e teriam acesso ao método (Dados discutidos informalmente com professor Dr. Omar Feres, presidente da SBMH nos anos de 2010-2012, 2012-2014). Com isso podemos comparar, por exemplo, quanto seria um dia de internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) com uma sessão de 2h de OHB, um dia de antibiótico com uma sessão de 2h de OHB ou até mesmo se seria possível impedir a progressão de danos cerebrais antes da realização da cirurgia derivação, diminuindo o risco de infecções, instabilidade clínica, afecções motoras e cognitivas, entre outros.

Baseado em todos os seus mecanismos de ação já encontrados e os que ainda estão em fase de estudo, imaginamos que a associação da OHB com o tratamento cirúrgico da hidrocefalia poderia gerar uma redução de gastos, principalmente na diminuição de tempo de internação e no uso de medicamentos. Desta forma, acreditamos que novas pesquisas que abordem essa questão econômica sejam necessárias e que possam trazer resultados interessantes para o âmbito clínico e para um possível melhor prognóstico aos pacientes.

JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

Nem todos os pacientes hidrocefálicos podem ser submetidos ao tratamento da derivação liquórica imediatamente após o diagnóstico, em especial devido a presença de possíveis condições clínicas desfavoráveis, como instabilidade hemodinâmica, infecções, entre outras. Assim, a busca de manobras ou drogas neuroprotetoras que possam reduzir as lesões secundárias à hidrocefalia até a instauração de um tratamento definitivo é essencial.

A neuroproteção, definida como uma intervenção não necessariamente farmacológica, visa impedir os mecanismos intracelulares da cascata isquêmica e da morte celular. Através desta intervenção, é possível resgatar áreas de hipoperfusão ainda viáveis e aumentar a resistência neuronal frente a um estímulo agressor. São consideradas medidas neuroprotetoras todas aquelas que melhoram o suprimento sanguíneo tecidual e aumentam a viabilidade da célula diante da circulação prejudicada (ZAGER; AMES, 1988). Como a isquemia cerebral está frequentemente associada à fisiopatologia da hidrocefalia, a OHB como intervenção neuroprotetora, poderia reverter o processo isquêmico por aumentar a oferta de O₂ aos tecidos e promover o bloqueio/atraso do processo patológico para recuperação do tecido já lesado.

Em um estudo prévio de nosso grupo de pesquisa (DA SILVA *et al.*, 2018), observamos que a OHB possui amplo potencial terapêutico para reduzir algumas lesões secundárias causadas pela hidrocefalia, como, por exemplo, a astrogliose reativa no corpo caloso e na matriz germinativa. A terapia hiperbárica também mostrou ser benéfica na preservação de células mitóticas na matriz germinativa e melhorou de forma significativa o desempenho comportamental dos animais, tanto em testes motores quanto no teste de memória. Portanto, no presente estudo, avaliamos a associação da terapia hiperbárica com o tratamento padrão da hidrocefalia, a cirurgia de derivação liquórica e buscamos explicar os principais mecanismos de ação da OHB envolvidos na hidrocefalia experimental.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Observar se a terapia hiperbárica, quando associada à derivação liquórica, pode oferecer benefícios neuroprotetores para as estruturas afetadas pela ventriculomegalia e explicar quais os principais mecanismos envolvidos nessa ação.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar o desenvolvimento motor e a exploração do ambiente através do teste de campo aberto e a aprendizagem e memória através dos testes de reconhecimento de objeto e o labirinto aquático de *Morris* modificado.

Avaliar a citoarquitetura geral através de histologia convencional com a coloração hematoxilina e eosina (HE) e a mielinização tecidual, através do corante Luxol *Fast Blue* (LFB). E, na imunoistoquímica, avaliar a astrogliose reativa, a proliferação celular, a apoptose, a neuroinflamação, a ação antioxidante da OHB e a preservação do número total de neurônios, de acordo com a proteína correspondente.

Quantificar as proteínas específicas GFAP (*glial fibrillary acid protein*) e MBP (*myelin basic protein*) no córtex dorsal ao ventrículo lateral e no hipocampo através de análise bioquímica por ELISA.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados 60 ratos machos com 7 dias de vida da linhagem Wistar Hannover oriundos do Serviço de Biotério Central da USP-RP. Os animais foram 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 (FMRP). Os animais permaneceram no biotério junto à mãe para amamentação durante os 28 dias de experimento, sendo os primeiros sete dias para cumprir o período de habituação. O período de 28 dias de vida dos ratos foi adotado devido à similaridade de maturação neurológica, equivalente a um humano com $\pm$ seis meses de vida pós-natal (KHAN; ENNO; DEL BIGIO, 2006). Cada ninhada era constituída por oito filhotes e uma rata-mãe. As mães e os filhotes em fase de desmame tinham livre acesso à dieta padrão para roedores e água ad libitum. As caixas-alojamento possuem o tamanho de 38x20x13 cm e eram recobertas com maravalha. O biotério utilizado tem controle do ciclo claro-escuro de 12/12h, temperatura média de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade do ar de 49%. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e a quantidade de animais utilizados. Em caso de sofrimento e se o animal apresentasse sinais de desidratação, se o quadro não fosse revertido com aplicação diária de soro fisiológico, o animal era eutanasiado por aprofundamento anestésico e descartado do estudo.

Os animais foram subdivididos aleatoriamente em seis grupos: controle (C) (n=10); controle associado à oxigenoterapia hiperbárica (COHB) (n=10); hidrocefálico sem tratamento (HNT) (n=10), hidrocefálico tratado com oxigenoterapia hiperbárica (HTO) (n=10), hidrocefálico tratado com derivação (HTD) (n=10) e hidrocefálico tratado com oxigenoterapia hiperbárica + derivação (HTOD) (n=10). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – FMRP-USP, protocolo n°214/2017 (Anexo 1).

5.2. Indução da hidrocefalia

Com sete dias de idade, os filhotes foram escolhidos aleatoriamente e submetidos à indução da hidrocefalia pelo método de injeção intracisternal de caulim, sob anestesia inalatória de 2% de Isoflurano (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil) ou mantidos sem intervenção para utilização como controle normal. Para indução da hidrocefalia, um auxiliar posiciona a cabeça do animal com uma mão e o corpo com a outra, flexiona o pescoço do animal e deixa livre a

região cervical dorsal. Através da palpação, foi identificado o espaço entre a margem posterior do forame magno, no osso occipital, e a borda cranial do arco dorsal da primeira vértebra cervical (fig.3). Com uma agulha odontológica Mise 0,3, de bisel curto, foi realizada a injeção lenta de 0,04 ml da suspensão de caulim (Sigma, St. Louis, MO) a 15% em água destilada e esterilizada em autoclave. Após a injeção, os filhotes foram observados até completa recuperação e então recolocados em sua caixa-alojamento de origem, retornando ao biotério.

Figura 3 – Indução de hidrocefalia

Figura 3: Indução da hidrocefalia. Em **A** o auxiliar posiciona o animal e o pesquisador realiza a injeção lenta na cisterna magna com caulim 15%. Em **B**, o mesmo animal 20 dias após a indução de hidrocefalia, exibindo macrocrania e vasodilatação na pele que recobre a calvária (esse rato teve os pelos da pele calvária raspados como preparação do exame de ultrassonografia).

Fonte: acervo do laboratório de Proteção Cerebral na Infância.

5.3. Câmara hiperbárica experimental

A câmara hiperbárica experimental possui dimensões de 70 cm de comprimento, 63 cm de altura, diâmetro externo de 86 cm e interno de 78 cm (fig. 4A). É composta também por uma vigia de acrílico para visualização e monitoramento dos animais, válvula de controle na entrada, manômetro diferencial (kgf/cm²) para controle da pressão interna, fluxímetro na saída para a manutenção do ciclo entrada/saída e temperatura interna controlada entre 21 e 22° C com termômetro, localizada no laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental no Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP. Para a realização das sessões de OHB, os animais foram alocados em caixas plásticas (máximo de cinco animais por caixa) e colocados no interior da câmara hiperbárica experimental. As caixas permitiam a livre movimentação dos animais durante todo o procedimento (fig. 4B). A câmara hiperbárica foi pressurizada diretamente com oxigênio puro (100%) a três atmosferas absolutas.

Os animais receberam as sessões terapêuticas diárias de OHB durante 21 dias consecutivos no período da manhã. A sessões consistiam em 15 minutos de pressurização lenta até três ATA, 90 minutos de pressão estável (tempo de fundo) e 15 minutos finais para despressurização (fig. 4C). Ao final de cada sessão de OHB os animais foram observados por aproximadamente 15 minutos para averiguar se não houveram efeitos adversos após o tratamento como: sangramento auditivo, vômitos e/ou distensão abdominal.

Figura 4 – Câmara hiperbárica experimental

Figura 4: A) Câmara hiperbárica experimental fotografada no momento de sua aplicação. O equipamento possui o manômetro que indica a pressão utilizada durante a sessão de tratamento. B) Posicionamento da caixa plástica com animais no interior da câmara hiperbárica. Os animais foram colocados logo abaixo do visor de acrílico para melhor observação durante o experimento. C): Esquema de uma sessão de OHB. **P:** Pressurização lenta (15 minutos). **Tempo de fundo:** 90 minutos (três ATA). **D:** Despressurização lenta (15 minutos). **ATA:** Atmosfera absoluta (pressão). **T:** Duração total da sessão: 120 minutos. Concentração de 100% de O₂.

Fonte: acervo pessoal.

Vale salientar que a unidade de medida observada no manômetro (fig. 5) durante a aplicação da câmara hiperbárica é igual a dois kgf/cm^2 (força gravitacional exercida sobre um corpo) e que representa duas ATA no interior da câmara, porém, a pressão atmosférica que é exercida naturalmente sobre a terra (fora da câmara), equivale a uma ATA ao nível do mar (0° de altitude) representando a pressão ambiente. A cidade de Ribeirão Preto (local em que o experimento é realizado), localiza-se a 546 m acima do nível do mar, valor que representa aproximadamente 1,06 ATA. Em resumo, as duas ATA presentes no interior da câmara se associam com uma ATA da pressão existente no ambiente e resulta na soma de três ATA para os animais pressurizados.

Figura 5 - Manômetro da câmara hiperbárica

Figura 5: Manômetro utilizado para ajustar a pressão no interior da câmara hiperbárica. A seta aponta para dois kgf/cm^2 que equivale a três ATA, sendo duas ATM no interior da câmara e uma ATM fora da câmara, no ambiente externo. Ao lado do manômetro encontra-se o termômetro indicando a temperatura média no interior da câmara.

Fonte: acervo pessoal.

5.4. Avaliação por ultrassonografia transcraniana

No 6º dia (P6) e no 20º dia (P20) pós-indução de hidrocefalia, os animais hidrocefálicos foram submetidos ao exame de ultrassonografia transcraniana (UST). Após anestesia inalatória com Isoflurano 2% (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil), foi feita a tricotomia da pelagem na região da calvária. Após a retirada dos pelos, os animais foram

posicionados em decúbito ventral em plataforma aquecida. A captura das imagens foi feita com o equipamento VEVO 2100 (VisualSonics), com transdutor de 30 MHz posicionado no vértice. Imagens seriais da região ventricular cerebral foram feitas no plano coronal. Os exames foram realizados no Laboratório Multiusuário de Ultrassom e Ecocardiografia em Pequenos Animais, no prédio da Cirurgia Experimental - FMRP. Através das imagens de UST foi possível identificar os ventrículos laterais no plano coronal e quantificar o tamanho ventricular (grau de hidrocefalia) (fig. 6). Todo o método de utilização e aplicação do ultrassom na hidrocefalia experimental já foi padronizado por nosso grupo (DE MOURA SILVA *et al.*, 2021).

Após o exame, os animais foram observados durante 15 minutos antes de serem realocados com a rata-mãe na caixa-alojamento. Os dados foram quantificados através do cálculo da razão ventricular: diâmetro ventricular/diâmetro cerebral. As medidas foram feitas através do programa VEVO 2100 com base na visualização do primeiro segmento da extremidade anterior do terceiro ventrículo e no forame interventricular, no plano coronal.

Figura 6 – Procedimentos para realização da ultrassonografia transcraniana

Figura 6: Ultrassonografia transcraniana: procedimentos e avaliação. **A:** foto realizada durante o momento exato da avaliação com a manipulação do transdutor pelo profissional responsável (a técnica de UST precisa ser operada por um profissional treinado, assim, evita-se imagens distorcidas ou com baixa qualidade durante o exame). **B:** Imagem de ultrassonografia com a visualização dos ventrículos laterais (*) de um animal hidrocefálico.

5.5. Derivação liquórica ventrículo-subcutânea

No sétimo dia pós-hidrocefalia (P7), a cirurgia de derivação liquórica foi realizada. A cirurgia é chamada de derivação ventrículo-subcutânea (DVS), pois, direciona o LCR em excesso dos ventrículos laterais para o espaço subcutâneo do dorso dos animais.

Os ratos foram anestesiados via inalatória com Isoflurano 2% (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil), e posicionados em decúbito ventral. Após administração de antibioticoterapia profilática com Cefalotina 50mg/kg (ABL, Cosmópolis, Brasil) intraperitoneal (ip), tricotomia da cabeça, antissepsia da pele da cabeça e do dorso, utilizando uma solução de iodopolividona, e colocação de campos operatórios, uma pequena incisão é realizada na cabeça, 3 mm à direita da linha média e 2 mm à frente da sutura coronal, envolvendo todos os planos do tegumento, para exposição óssea. A seguir, é feito um orifício no crânio com 1mm de diâmetro com auxílio de um perfurador elétrico rotativo, com ponta delicada, seguido da cauterização. O ventrículo lateral direito é puncionado com cateter de polipropileno de 0,7 mm de diâmetro e 8 mm de comprimento, angulado em 90°, conectado a um cateter de silastic que, após passagem pelo subcutâneo do pescoço, é sepultado no subcutâneo do dorso, próximo à raiz da cauda. Para todo o procedimento cirúrgico foi utilizada técnica asséptica, com o sistema de derivação esterilizado em óxido de etileno e todos os materiais cirúrgicos esterilizados em autoclave. Após sutura da incisão cutânea, com mononylon 4.0 e recuperação anestésica, os animais retornam à caixa-alojamento de origem. Todo procedimento cirúrgico já foi previamente estabelecido por nosso grupo de pesquisa (SANTOS *et al.*, 2016) e vem sendo amplamente utilizado. O esquema da implantação do cateter, posicionamento da válvula e a cicatrização cirúrgica podem ser observado na figura 7.

Figura 7 – Esquema de implantação do cateter para derivação liquórica

Figura 7: Cirurgia de derivação liquórica ventrículo-subcutânea. **A:** rato posicionado para início da cirurgia. **B:** antissepsia da pele da cabeça e do dorso com solução de iodopolividona. **C:** após a realização da punção ventricular, observa-se a saída de líquido pelo cateter (setas), assegurando a implantação no local exato. **D:** o cateter é sepultado no subcutâneo do dorso do animal e, em seguida, é feita a sutura da incisão cutânea. **E:** animal sete dias após a derivação liquórica, com cicatrização quase completa. **F:** posicionamento da válvula - cateter inserido no ventrículo lateral direito, visto tanto no plano superior à esquerda, quanto no coronal à direita e, abaixo, posicionamento da cânula no dorso do animal.

Fonte: imagens dos animais (A-E) acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância. Imagem F, elaborada e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ivair Matias Júnior, adaptado de Watson; Paxinos, 2007.

5.6. Estudos comportamentais

5.6.1. Avaliação do peso corporal

Os animais foram pesados diariamente em balança semi-analítica SSR3000 (Bel Engineering®, Monza, Itália) e seus pesos registrados. Ao final do período experimental foi observado a porcentagem de ganho ponderal ($\text{peso final} - \text{peso inicial} / \text{peso final} \times 100$).

5.6.2. Teste de campo aberto

O teste foi realizado a cada dois dias a partir do 6º dia pós-indução (P6) até o 20º dia (P20). Cada animal foi observado individualmente em uma arena de acrílico transparente 60 x 60 x 35 cm por dois minutos (fig. 8). Foram analisados o tempo de permanência no centro e nas bordas da arena, exploração vertical (tempo em que o animal permaneceu em pé), número de defecações (assim como no protocolo original), tempo de permanência em grooming (autolimpeza corporal) e um escore da avaliação motora com a seguinte pontuação: 4 - alerta, com exploração e marcha normal; 3 - discretamente letárgico, com atividade reduzida, mas com marcha normal quando estimulado; 2 - cifótico, consegue caminhar, porém a marcha apresenta base alargada, instável ou atáxica; 1 - mal consegue andar, mas ainda se alimenta; 0 – imóvel. A cada avaliação, a arena foi limpa com sabão neutro diluído em água para que o cheiro não interfira. As filmagens captadas foram analisadas através do software X-PloRat 2005, exportadas em Excel e avaliadas por observadores cegos ao tratamento.

Figura 8 – Teste de campo aberto (*open field*)

Figura 8: Teste de campo aberto. A) Arena de acrílico transparente para análise do comportamento deambulatorio dos animais B) Rato posicionado na extremidade da arena durante exploração vertical. Imagem captada durante a filmagem. Tempo: 120 segundos.

Fonte: acervo pessoal.

5.6.3. Labirinto aquático de Morris modificado

Para o estudo da memória e aprendizagem espacial, os animais foram submetidos ao teste de labirinto aquático. O teste é composto por uma piscina circular (90 cm de diâmetro, 50 cm de altura) e uma plataforma transparente (28 cm de altura, 9,5 cm de diâmetro) posicionada a dois centímetros abaixo da superfície da água. O tanque, preenchido com água em temperatura controlada (22 a 24°C), foi dividido em quatro quadrantes imaginários numerados em sentido horário (1, 2, 3 e 4) e a plataforma foi inserida no quadrante 1 (fig. 9). A sala que abriga o tanque é totalmente escura, exceto por uma pequena fonte luminosa fixada próxima a um dos lados externos do tanque (norte), para que o animal identifique o ponto de referência a ser memorizado. O teste foi feito em duas fases (adaptação e aprendizagem espacial). A fase de adaptação foi realizada no 14º dia pós-indução da hidrocefalia (P14), em que os ratos nadavam por 60 segundos em cada ponto cardeal e se familiarizavam com o local da plataforma. Já a fase de aprendizagem espacial foi realizada em P15, P16, P17 e P18 em dois blocos (manhã e tarde) com três horas de descanso entre eles. O teste foi feito em quatro séries, sendo que em cada uma, o animal foi colocado na água com o focinho voltado para um dos quatro pontos cardiais (esse cuidado deve ser tomado para que o filhote memorize a parede iluminada e a use como ponto de referência para localizar a plataforma submersa, e não o encontro ao acaso da mesma pela natação livre). O tempo limite para o animal alcançar a plataforma e ser considerado um acerto foi de 60 segundos, com 15 segundos de descanso entre cada sessão. Caso o animal não a tenha encontrado, o tempo de 60 segundos foi registrado. Entre cada animal examinado, toda sujeira (dejetos sólidos e partículas da cama de maravalha) visível na água foi retirada com o auxílio de uma peneira. O parâmetro analisado é a latência de fuga: tempo despendido pelo animal para encontrar a plataforma submersa em cada uma das sessões. Os dados das quatro posições iniciais são agrupados para fornecer dados em média por bloco de teste.

Na última análise, realizada em P18 no período da tarde, foi realizado o teste de exploração, em que a plataforma é removida da piscina e o animal treinado pode nadar livremente por um período de 60 segundos. A precisão espacial é determinada, representada pelo tempo que o animal gasta procurando a plataforma no quadrante onde ela estava (quadrante alvo). Desta forma, podemos avaliar se o treinamento fez com que o animal aprendesse e memorizasse o local da plataforma. No final dos testes, cada animal foi seco com uma toalha, mantido em caixa aquecida, e após, realocado junto à ninhada. Os vídeos registrados em P18 foram avaliados através do software X-ploRat 2005 e os dados exportados em Excel.

Figura 9 – Labirinto aquático de Morris modificado (*water maze*)

Figura 9: Labirinto aquático de Morris modificado. **A:** Piscina vazia evidenciando a plataforma em acrílico; **B:** Piscina já cheia com o animal em cima da plataforma de descanso; **C:** Imagem captada durante a filmagem em P18, com o animal nadando no quadrante alvo. **D:** Esquema do labirinto aquático de Morris por Lynn Talton, Núcleo de Testes Comportamentais da UCLA. Retirado e adaptado do artigo "*Associative Basis of Landmark Learning and Integration in Vertebrates*" (LEISING; BLAISDELL, 2009).

Fonte: acervo pessoal.

5.6.4. Reconhecimento de objeto

No primeiro dia (P19), os animais se habituaram na arena de teste por uma hora. A arena possui formato retangular, 40 cm de largura × 30 cm de comprimento × 30 cm de altura e aberta superiormente. O segundo dia (P20), consiste em duas fases: 1) aquisição, em que os animais exploram a arena contendo dois objetos idênticos posicionados no centro da caixa durante cinco minutos, e 2) ensaio-teste, realizado após duas horas da aquisição, em que um dos dois objetos é substituído por um novo objeto, sendo ele diferente quanto à cor e forma e os animais também tiveram cinco minutos para explorá-los. O tempo gasto de exploração foi cronometrado desde o momento em que o rato aproximou seu focinho a mais ou menos um centímetro do objeto. Os dados foram expressos de acordo com índice de reconhecimento (IR%), calculado como a percentagem do tempo de exploração do objeto novo / tempo de exploração do objeto novo + tempo de exploração do objeto familiar × 100. O comportamento dos roedores foi analisado por um observador cego em relação ao tratamento. A esquematização do teste pode ser vista na figura 10. As filmagens captadas foram analisadas através do software X-PloRat 2005 e exportadas em Excel.

Figura 10 - Reconhecimento de objetos

Figura 10: Representação das fases do teste de reconhecimento de objetos. **A)** Habituação realizada no primeiro dia; **B)** Aquisição – objetos idênticos **C)** Ensaio teste - realizado 2h após a aquisição, com objetos diferentes. Abaixo, as imagens captadas através das filmagens, mostrando momentos em que o roedor explorou os objetos idênticos e diferentes.

Fonte: acervo pessoal.

5.7. Eutanásia e coleta das amostras

Com 21 dias pós-indução de hidrocefalia, os animais foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina e xilazina (nas doses de 60mg/kg e 10mg/kg, respectivamente). Com uma agulha hipodérmica 25 x 0,8 mm (21G x 1), a solução salina foi introduzida na ponta do ventrículo esquerdo e canulada até a raiz da aorta (perfusão transcardíaca) após uma pequena incisão na aurícula direita. A solução foi injetada até a observação do clareamento do líquido de saída (cerca de 1 ml/g de peso do animal), com auxílio de uma bomba de perfusão peristáltica (Bonther, Ribeirão Preto, Brasil). A seguir, os animais foram decapitados e seus encéfalos retirados em bloco, através da craniectomia de vértex.

Imediatamente após sua retirada, cada encéfalo foi dividido no plano sagital. A metade esquerda foi subdividida em quatro porções, sendo elas: córtex dorsal ao ventrículo lateral, hipocampo, núcleos da base e tronco/cerebelo. Cada porção foi acondicionada em tubo tipo *ependorf* devidamente identificado, mergulhado em nitrogênio líquido para congelamento rápido e armazenada em ultrafreezer -80°C. Já a metade direita do encéfalo foi subdividida no plano coronal, em uma porção anterior e outra posterior, tomando-se como referencial o

quiasma óptico, depois imersas em uma solução fixadora de paraformaldeído a 3% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3 – 7,4), por 24 horas à temperatura de 4°C, quando foi trocada por uma solução de paraformaldeído 3% fresca, permanecendo nesta solução fixadora por mais sete dias à mesma temperatura e, a seguir, emblocadas em parafina. As amostras de tecido congelado foram posteriormente homogeneizadas em água bidestilada adicionada a um inibidor de proteinase (TRIS), em proporção constante para todas as amostras, aliquotadas, recongeladas em nitrogênio líquido e mantidas em ultrafreezer -80°C para a realização das análises bioquímicas.

5.8. Análises histológicas

As amostras foram desidratadas em soluções crescentes de álcool (50% a 100%), diafanizadas em xilol e emblocadas em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em plano coronal em micrótomo rotativo em secções de 5µm de espessura para análise por HE e 8 µm para análise por LFB. A seguir, os cortes foram estendidos em lâminas histológicas para microscopia (Knittel, Lowestoft, Reino Unido). As lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por uma hora. A seguir, os cortes foram desparafinizados em banhos sequenciais de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água. Posteriormente, foram corados com HE e LFB. Na coloração feita por HE, observamos a citoarquitetura geral, a distribuição das estruturas e a densidade celular. Os núcleos corados pela hematoxilina ficam evidenciados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, visualizados em rosa. As regiões analisadas na parte anterior do cérebro incluem: corpo caloso, matriz germinativa e o córtex dorsal ao corpo caloso; e na parte posterior realizamos o cálculo do índice de picnose ($IP\% = \text{neurônios picnóticos} / \text{neurônios normais} \times 100$) nas sub-regiões hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e giro denteado (GD), na região do bregma -3.84 (PAXINOS; WATSON, 2007).

Já o LFB, foi utilizado para distinguir a substância branca, analisar a mielinização e quantificar a espessura do corpo caloso. O grau de mielinização foi quantificado através de confronto visual e aplicação de um escore de intensidade da cor azul, em que uma tonalidade mais escura é vista em regiões com maior densidade de mielina, e tonalidades mais claras em regiões com menor densidade de mielina. O escore foi aplicado foi: 0= tonalidade fraca; 1= tonalidade média; e 2= tonalidade forte. Além disso, foi medida a espessura do corpo caloso através do software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

5.9. Análises imunoistoquímicas

Para realização das análises imunoistoquímicas os cortes estendidos foram fixados em lâminas silanizadas Starfrost (Knittel, Lowestoft, Reino Unido). Após o período de secagem, as lâminas foram mantidas em estufa a 60° C por 30 min e desparafinizadas em banhos sequenciais de xilol e álcool. Todas as análises imunoistoquímicas foram feitas por três observadores cegos ao tratamento e contabilizadas pelo software ImageJ. As proteínas estudadas foram:

5.9.1. GFAP

A avaliação por GFAP, uma proteína filamentosa intracitoplasmática, foi feita para observar a distribuição e aspecto morfológico da astróglia no corpo caloso, no córtex dorsal ao ventrículo lateral e no hipocampo. Foi avaliada a densidade celular e seu escore de marcação baseado na intensidade de marcação e na morfologia do astrócito, sendo: 0: ausência de astrócitos reativos; 1: astrócitos reativos com prolongamentos finos e delicados; 2: astrócitos reativos com prolongamentos moderadamente grossos; 3: astrócitos reativos fortemente marcados e com prolongamentos muito grossos.

5.9.2. Ki-67

A análise de Ki-67, uma proteína nuclear, foi feita para avaliar a replicação celular na matriz germinativa, área de intensa proliferação celular, através da quantificação e cálculo da densidade de células marcadas. Foram contadas as células marcadas em divisão mitótica e as células totais e depois feito o cálculo da densidade (células positivas/total de células x100).

5.9.3. Caspase-3

A análise da Caspase-3, uma proteína citoplasmática, foi utilizada para avaliar a apoptose no tecido cerebral. Foi feita uma varredura em toda a extensão do corpo caloso e córtex cerebral dorsal ao ventrículo lateral, contadas todas as células marcadas nessas regiões e feito o cálculo da densidade (células positivas/total de células x100).

5.9.4. COX-2

A imunoistoquímica para a ciclooxigenase-2 (COX-2), uma proteína de membrana, foi realizada para avaliar a neuroinflamação. Foram analisadas as regiões do córtex dorsal ao ventrículo lateral, corpo caloso, matriz germinativa, hipocampo (CA1, CA2, CA3 e giro denteado) e o córtex dorsal ao hipocampo, contabilizadas as células imunomarcadas e feito o cálculo de densidade de marcação (células positivas/total de células x100).

5.9.5. NeuN

Para determinar se a hidrocefalia e seus respectivos tratamentos estudados alteram/preservam o número total e a densidade de neurônios, realizamos a análise imunoistoquímica para NeuN (*neuronal nuclei*) de localização nuclear e citoplasmática. Foram analisadas as regiões do córtex dorsal ao ventrículo lateral, as subáreas hipocâmpais (CA1, CA2, CA3 e giro denteado) e o córtex dorsal ao hipocampo. Foram feitos o cálculo da densidade celular (nº total de neurônios/área), cálculo da porcentagem de marcação (células positivas/total de células x100) e a aplicação de um escore de intensidade de marcação (1- marcação leve, marrom claro, 2- marcação média, marrom em tom caramelo e 3- marcação forte, marrom escuro) para observar a imunorreatividade de NeuN após o insulto neural. Devido a quantidade de anticorpo disponível em nosso laboratório, realizamos a análise apenas dos quatro grupos hidrocefálicos.

5.9.6. SOD1

Para a avaliação do efeito antioxidante da OHB, realizamos a imunoistoquímica para SOD1, de localização citoplasmática. Quando ativada, esta enzima regula os níveis de espécies reativas de oxigênio, desempenhando assim um papel importante na homeostase do tecido. A SOD1 catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, atuando como uma importante defesa antioxidante na maioria das células expostas ao O₂. Foram analisadas as regiões do córtex dorsal ao corpo caloso, córtex dorsal ao hipocampo e as sub-regiões CA1 e giro denteado do hipocampo. Foram feitos o cálculo da densidade celular (nº total de células/área), cálculo da porcentagem de marcação (células positivas/total de células x100) e a aplicação de um escore de intensidade de marcação (1- marcação leve, marrom claro, 2- marcação média, marrom em tom caramelo e 3- marcação forte, marrom escuro).

O protocolo utilizado na imunoistoquímica inclui o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol (Dinâmica®, Indaiatuba, Brasil). Posteriormente é feito o bloqueio com soro adequado a 10% (Ab7481, Abcam, Cambridge, Reino Unido) diluído em PBS (*phosphate-buffered saline*), por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram incubados “overnight” à temperatura de 4° C com o anticorpo primário anti-GFAP Z0334 1:2000 (DAKO, Santa Clara, EUA), anti-COX2 1:2000 Ab15191, anti-NeuN Ab104225 1:1000 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), anti-Ki-67 SC-23900 1:40, anti-caspase-3 SC-56053 1:25 (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA) e anti-SOD1 1:500 AF5198 (Affinity Research, Perth, Austrália). Após lavar o anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado (biotinilado de cabra anti-rabbit SC-2040 ou anti-mouse SC-2039, Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA) diluído 1:300 em BSA. Após, foram incubados com o conjugado estreptavidina - HRP 405210 (BioLegend, Califórnia, EUA) diluído 1:400 em PBS. A seguir, foram revelados com DAB (3,3-diaminobenzidina D8001, Merck Millipore, Massachusetts, EUA). Por fim, as lâminas foram submetidas à contra coloração com hematoxilina, lavadas em água corrente, desidratadas por uma série sequencial de banhos crescentes de álcool e xilol, e recobertas por lamínulas montadas com Permount (Fisher Scientific, Hampton, EUA).

5.10. Quantificação de proteínas totais - *Coomassie – Bradford*

Para a realização do ensaio *Coomassie Bradford*, tubos tipo *ependorf* de 1,5 ml foram preparados com soluções-padrão de albumina nas seguintes concentrações:

Quadro 1 – Quantificação de proteínas totais

Quadro 1: Valores utilizados para quantificar as proteínas totais presentes no cérebro do rato.

TUBO	Volume de solução de albumina (0,1 mg/ml)	Volume de H ₂ O	Concentração final de albumina
A	400 µl	100 µl	40 µg/ml
B	200 µl	300 µl	20 µg/ml
C	150 µl	350 µl	15 µg/ml
D	125 µl	375 µl	12,5 µg/ml
E	100 µl	400 µl	10 µg/ml
F	50 µl	450 µl	5 µg/ml
G	25 µl	475 µl	2,5 µg/ml
H	0	500 µl	0

Fonte: acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância.

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

5.11. Quantificação de proteínas específicas por ELISA

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras determinadas foi utilizado o método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) em placa de 96 poços para titulação das proteínas GFAP e MBP. Cada ensaio começa com a cobertura de uma placa de 96 poços com 100ul/poço de uma solução de anticorpo policlonal GFAP Z0334 (DAKO, Santa Clara, EUA); MBP Ab28541 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) contra a proteína a ser quantificada, na concentração de 1ug/ml em PBS, “overnight” em geladeira a 4°C . No dia seguinte, a placa foi lavada 4 vezes com PBS. A seguir, fez-se o bloqueio com 100ul/poço uma solução a 5% de leite desnatado em PBST (0,5% de Triton em PBS). Após 1 hora, a placa foi lavada 4 vezes com PBST. Em seguida foi aplicado 100ul/poço do padrão da proteína a ser dosada diluída em PBST GFAP AG230; MBP 13-104 (Merck Millipore, Massachusetts, EUA) em diluições de 1, 5, 25, 50, 75, 100 e 150 ng/ml, em triplicata. Também em triplicata, foram aplicadas as amostras diluídas em PBST (100ul/poço), nos poços remanescentes. Após 1 hora de incubação, a placa foi novamente lavada 4 vezes com PBST e, a seguir, foi aplicada, em todos os poços, uma solução de anticorpo monoclonal GFAP MB360; MBP MAB386 (Merck Millipore, Massachusetts, EUA) contra a proteína a ser quantificada (100ul/poço), diluída em 1:5000 em leite desnatado a 5% em PBST. Depois de 1 hora, a placa foi novamente lavada com PBST 4 vezes, e 100ul/poço de uma solução de anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina anti-mouse Ab6790 (Abcam, Cambridge, Reino Unido), também diluído em leite desnatado a 5% em PBST, na concentração de 0,5ug/ml foi aplicada em todos os poços. Novamente a placa foi lavada 4 vezes com PBST, após 1 hora de incubação. A seguir, foi aplicado 100ul/poço do substrato de fosfatase Pierce™ PNPP Substrate 37620, (Thermo Fischer Scientific, Massachussets, EUA) preparado de acordo com as instruções do fabricante. A placa foi, então, mantida em local escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. A seguir, foi aplicada

50ul/poço de uma solução 2N de NaOH (1702-1 Dinâmica, SP, Brasil) para parar a reação, e imediatamente em seguida a placa foi lida em leitora automática de microplacas, no comprimento de 450 nm. Os valores encontrados foram corrigidos de acordo com a concentração de proteínas totais, previamente quantificadas para cada amostra, pelo ensaio de *Coomassie - Bradford*. A anotação foi de x mg de proteína específica/g de proteínas totais.

5.12. Documentação fotográfica

Foi utilizado o microscópio Nikon Eclipse E 200 MV com sistema de captura digital de imagens (MOTICAN 10), com software dedicado em ambiente Windows MOTIC image plus 2.0, como também os microscópios de luz AxiosKop2 Plus (Carl Zeiss) e uma câmera digital AxioCam Hrc (Carl Zeiss) acoplados à um computador Pentium II equipado com o software Axio Vision 3.1, do Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da FMRP – USP.

Nas lâminas coradas com HE foram fotografadas a região do corpo caloso, matriz germinativa, córtex dorsal ao ventrículo lateral e hipocampo em objetiva de 40X. As lâminas coradas com LFB foi fotografada a região do corpo caloso (objetiva de 20X). Todas as lâminas de imunistoquímica foram fotografadas na objetiva de 40X, sendo as principais áreas de interesse o corpo caloso, o córtex dorsal ao corpo caloso, a matriz germinativa, o hipocampo e o córtex dorsal ao hipocampo de acordo com a imunistoquímica correspondente.

5.13. Análise estatística

Todos os dados foram descritos com média e $\pm$ desvio padrão. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software In., San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade pelo teste de Kolmogorov Smirnov e, em seguida, analisados. Testes paramétricos foram utilizados para comparações de grupos com dados normalmente distribuídos (análise de variância - ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey), e testes não-paramétricos foram usados para outras comparações (Kruskall-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn). As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$, com intervalo de confiança (IC) de 95%.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação do peso corporal

Todos os grupos iniciaram o experimento com pesos semelhantes (em média 19,4 g) e registraram aumento progressivo do ganho ponderal até a última pesagem em P21 (fig. 11). Os pesos finais registrados foram: C= 82,5 g, COHB= 77,1 g, HNT= 69,6 g, HTO= 73,9 g, HTD= 83 g, e HTOD= 75,8 g.

Figura 11 – Progressão linear do peso em 21 dias de experimento

Figura 11: Gráfico da progressão linear de peso. Ainda que todos os grupos aumentaram progressivamente o ganho ponderal, a inclinação da curva nos mostra menor peso em P21 do grupo HNT (69,6 g) e maior ganho do grupo HTD (83 g).

Fonte: acervo pessoal.

Quando realizado o cálculo estatístico da porcentagem de ganho ponderal durante o período experimental (fig. 12), observamos diferenças entre o grupo C, com maior percentual de ganho de peso, e os grupos HNT ($p=0,001$) e HTO ($p=0,03$). As porcentagens encontradas foram de: C 76,2% ($\pm 1,1$), COHB 75,4% ($\pm 3,1$), HNT 71,9% ($\pm 3,9$), HTO 73,4% ($\pm 1,9$), HTD 74,8% ($\pm 2,5$) e HTOD 74,4% ($\pm 1,9$).

Figura 12 – Ganho ponderal em 21 dias

Figura 12: Gráfico da porcentagem do ganho ponderal durante os 21 dias de experimento. Observa-se que o grupo C foi o que mais ganhou peso durante o período avaliado (76,2%) e grupo HNT, o que menos ganhou (71,9%). Diferenças encontradas entre o grupo C e os grupos HNT e HTO ($p < 0,05$).

Fonte: acervo pessoal.

6.2. Avaliação em campo aberto

Na exploração da arena, em um período de 120 segundos, a maioria dos animais de ambos os grupos permaneceram em média 94 s nas bordas e 25,9 s no centro (fig. 13). Na avaliação da exploração vertical, quando era contabilizado o tempo em que os animais permaneciam apoiados apenas nas patas traseiras, o grupo HNT registrou o menor tempo (8,8 s $\pm 3,2$) neste comportamento. Os demais grupos registraram tempos semelhantes: C (15,4 s $\pm 8,2$), COHB (14,7 s $\pm 6,6$), HTO (15,7 s ± 12), HTD (11 s $\pm 8,7$) e HTOD (12,3 s $\pm 8,9$). Na análise do número médio de evacuações, obtivemos os seguintes dados: C 0,7 ($\pm 0,6$), COHB 1,3 ($\pm 1,8$), HNT 0,9 ($\pm 0,8$), HTO 0,1 ($\pm 0,2$), HTD 0,3 ($\pm 0,4$) e HTOD 0,4 ($\pm 0,5$). Na avaliação do *grooming*, a autolimpeza corporal, as médias de tempo dispendidas para este aspecto comportamental foram muito semelhantes entre os grupos: C 5,8 s (± 2), COHB 6 s ($\pm 3,2$), HNT 4,4 s ($\pm 2,6$), HTO 6,7 s ($\pm 3,1$), HTD 4 s ($\pm 2,5$) e HTOD 5,7 s ($\pm 3,3$). Por fim, na avaliação do comportamento motor, a mediana encontrada dos escores foi: 4 para os grupos C ($\pm 0,5$), COHB ($\pm 0,7$), HTD ($\pm 0,9$) e HTOD ($\pm 0,7$), grupo HTO com 3,5 ($\pm 0,9$) e grupo HNT com 3 ($\pm 0,8$), o que sugere menor desempenho motor no grupo sem tratamento. Os gráficos referentes a estas variáveis podem ser encontrados na figura 14.

Figura 13 – Exploração da arena de campo aberto

Figura 13: Valores médios do tempo, em segundos, gasto no centro e periferia do campo aberto. Observa-se a preferência de ambos os grupos pelas bordas da arena.

Fonte: acervo pessoal.

Figura 14 – Exploração vertical, evacuações, *grooming* e escore da avaliação motora

Figura 14: Gráficos referentes às variáveis analisadas de P6 a P20 no teste de campo aberto. **A:** exploração vertical, **B:** número de evacuações em 120 segundos, **C:** tempo de permanência realizando *grooming* (autolimpeza corporal) e **D:** escore obtido após avaliação motora. Em todas as avaliações não foram observadas diferenças, mas nota-se maior prejuízo funcional dos animais sem tratamento.

Fonte: acervo pessoal

6.3. Avaliação pelo labirinto aquático de Morris modificado

O primeiro contato dos animais com a piscina de teste foi realizado em P14, dia em que foi feita a habituação na piscina e a localização da plataforma submersa. Nesta etapa, realizamos o teste estatístico para ver se já conseguíamos observar diferenças entre os grupos. Como visto na figura 15, o grupo HTO já se destacou como o grupo mais ágil a encontrar a plataforma ($34,3 \text{ s} \pm 7,7$) ($p < 0,05$). Os animais dos grupos HNT e HTD registraram tempos mais longos $49,9 \text{ s} (\pm 10,2)$ e $48,6 \text{ s} (\pm 12,4)$, respectivamente.

Figura 15 – Média de tempo registrada no primeiro contato com a plataforma

Figura 15: Na fase de adaptação em P14, os animais do grupo HTO já se destacaram dos demais grupos e foram os mais ágeis a encontrar a plataforma submersa. Diferenças significativas encontradas entre HTO e os grupos HNT e HTD ($p < 0,05$).

Fonte: acervo pessoal.

De P15 ao P18, as avaliações foram realizadas em dois turnos diários, um pela manhã e outro pela tarde. Na avaliação 1, no período da manhã, observamos que o grupo HTO ($22 \text{ s} \pm 10,3$) continuou em destaque assim como na fase de adaptação, sendo o grupo mais ágil a encontrar a plataforma, com diferença dos grupos HNT e HTD ($p < 0,05$). O grupo HNT, permaneceu com o menor tempo para encontrar a plataforma submersa ($42,8 \text{ s} \pm 13,5$), também com diferença do grupo C ($25,9 \text{ s} \pm 6,1$) ($p = 0,03$), segundo grupo mais ágil neste momento. Já na avaliação do período da tarde, vemos que todos os grupos conseguiram diminuir o tempo para encontrar a plataforma, mas a diferença entre os grupos HTO e HTD, observada nas avaliações anteriores, se manteve ($p = 0,01$) sendo o grupo HTO o mais rápido. Na avaliação 2, realizada no período da manhã em P16, observamos diferença apenas entre os grupos C e HTD ($p = 0,0008$), com o grupo C encontrando a plataforma mais rapidamente que os demais grupos.

Já no período da tarde, diferenças foram encontradas entre os grupos C e HTD/HTOD ($p<0,05$), HTO e HTD/HTOD ($p<0,05$), sendo os grupos C e HTO os mais ágeis. Na manhã seguinte, em P17, todos os grupos otimizaram seus tempos, exceto o grupo HNT. Diferenças encontradas entre os grupos C e HNT/HTOD ($p<0,05$); COHB e HNT ($p=0,01$), HTO e HNT/HTOD ($p<0,05$), sendo os grupos C, COHB e HTO os mais ágeis no teste. No período da tarde, observamos resultados semelhantes aos obtidos pela manhã. Diferenças entre C e HNT/HTD/HTOD ($p<0,003$); HTO e HNT/HTD/HTOD ($p<0,003$). No período da manhã em P18, última avaliação com a plataforma submersa, vemos que todos os grupos diminuíram o tempo de encontro com a plataforma. Com o pior tempo registrado, temos o grupo HNT e, assim como nas avaliações anteriores, os grupos C, COHB e HTO foram os mais ágeis. Diferenças observadas entre C e HNT/HTD/HTOD ($p<0,05$); COHB e HNT ($p=0,04$) e HTO e HNT ($p=0,01$). Todos os gráficos de P15 a P18 podem ser observados na figura 16.

Figura 16 – Média de tempo para o encontro da plataforma de P15 ao P18

Figura 16: Gráficos referentes às avaliações de P15 a P18 com a plataforma submersa. Conforme o passar das avaliações, vemos que todos os grupos diminuíram o período de latência até encontrar a plataforma. Com destaque, o grupo HTO, um dos mais ágeis, com tempos semelhantes aos grupos controles. No geral, o pior desempenho encontrado pode ser atribuído ao grupo HNT.

Fonte: acervo pessoal.

Para enfatizar os resultados acima, mostramos o gráfico de progressão linear de P15 a P18. Vemos que todos os animais conseguiram diminuir o tempo necessário para chegar à plataforma. Em destaque, temos os grupos C, HTO e COHB como os mais ágeis, os grupos derivados com um tempo mediano e, com o pior tempo, o grupo HNT (fig. 17).

Figura 17 – Progressão linear de P15 a P18 do desempenho no teste de labirinto aquático

Figura 17: Gráfico de progressão linear de P15 a P18 no teste do labirinto aquático de Morris modificado. Os grupos mais ágeis do teste foram: C, HTO e COHB, seguidos dos dois grupos derivados e, com o pior desempenho, o grupo HNT.

Fonte: acervo pessoal.

No período da tarde em P18, realizamos a avaliação final sem a plataforma submersa, em que verificamos se os animais gravaram o quadrante em que a plataforma estava inserida ou se simplesmente a encontravam ao acaso durante o nado livre. O grupo HTOD foi o que permaneceu mais tempo no quadrante em que a plataforma estava inserida ($17,1 \pm 5,9$), seguido do grupo HTO ($16,7 \pm 3,8$). Ambos mostraram diferenças do grupo HNT ($p < 0,05$), com o menor tempo registrado no quadrante alvo ($6,6 \pm 4,7$) (fig. 18).

Figura 18 – Avaliação final em P18 sem a plataforma submersa

Figura 18: Gráfico da avaliação final, sem a plataforma submersa, no teste do labirinto aquático. É possível observar que os animais HTO e HTOD foram os grupos que permanecerem mais tempo explorando o quadrante alvo, com diferença do grupo HNT, com o menor tempo de exploração ($p < 0,05$).

Fonte: acervo pessoal.

6.4. Avaliação por reconhecimento de objeto

Na fase de aquisição, todos os animais exploraram de forma semelhante os objetos idênticos. Os grupos HTD ($64,5\% \pm 25,1$) e HTOD ($53,2\% \pm 33,9$) foram os que mais tiveram contato com os objetos, mas nenhuma diferença foi observada nesta etapa. Após duas horas, a segunda fase do teste foi realizada. Observamos que os grupos C ($64,3\% \pm 23,3$) e HTO ($65,8\% \pm 20,7$) foram os que mais exploraram o novo objeto e o grupo HNT, o que menos teve interação ($32,8 \pm 20,6$). Os animais derivados também exploraram mais o objeto novo do que o grupo sem tratamento, mas diferenças foram encontradas apenas entre os grupos HTO e HNT ($p=0,04$). Os gráficos podem ser observados na figura 19.

Figura 19 – Reconhecimento de objetos – aquisição e ensaio-teste

Figura 19: Gráficos do teste de reconhecimento de objetos: **A:** Fase 1, de aquisição e **B:** Fase 2, ensaio-teste. Em A é possível observar que todos os grupos exploraram os objetos presentes na arena, sendo os animais hidrocefálicos os que mais exploraram. Já em B, os animais do grupo HTO foram os que mais exploraram o novo objeto, com diferença significativa do grupo HNT ($p=0,04$).

Fonte: acervo pessoal.

6.5. Ultrassonografia transcraniana

Em P6, o grupo HTO apresentou média da razão ventricular ligeiramente maior que o grupo HNT (0,48 x 0,46, respectivamente). Já em P20, os animais não tratados aumentaram a média da razão ventricular para 0,53, enquanto o grupo HTO aumentou para 0,50. Na comparação entre os animais derivados, o grupo HTD, em P6, apresentou média da razão ventricular de 0,51 e o grupo HTOD de 0,52. Em P20, ambos os grupos diminuíram a média da razão ventricular para 0,44 no grupo HTD e 0,37 no grupo HTOD (fig. 20). Tais medidas nos mostram que a derivação ventrículo-subcutânea realizada foi funcional e diminuiu o tamanho da ventriculomegalia. Em porcentagem, o grupo HNT foi o que mais sofreu com o a progressão da hidrocefalia, com aumento de 15,3% entre as duas avaliações. O grupo HTO também apresentou aumento, porém, de apenas 3,9%. Já nos grupos derivados, com o funcionamento eficaz da cirurgia, o grupo HTD diminuiu em 12,8% a razão ventricular e o grupo HTOD diminuiu em 28,8% (fig. 21).

Figura 20 - Ultrassonografia transcraniana - P06 e P20

Figura 20: Imagens obtidas no exame de ultrassonografia transcraniana. **P6:** sexto dia pós-indução de hidrocefalia e um dia anterior à cirurgia de derivação liquórica. **P20:** vinte dias pós-indução de hidrocefalia, um dia anterior à eutanásia. O grupo HNT apresentou aumento do tamanho ventricular de 15,3% em P20, enquanto o grupo HTO aumentou apenas 3,9%. Já dentre os grupos derivados, houve diminuição do tamanho ventricular, sendo 12,8% para o grupo HTD e 28,8% para o grupo HTOD. A localização exata dos ventrículos laterais pode ser identificada pelo asterisco.

Fonte: acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância

Figura 21 - Gráfico da porcentagem da razão ventricular

Figura 21: Gráfico da porcentagem da razão ventricular entre P6 e P20. Os animais sem tratamento aumentaram em 15,3% a razão ventricular, enquanto o grupo HTO aumentou apenas 3,9%. Dentre os derivados, o grupo HTD diminuiu a razão ventricular em 12,8% e o grupo HTOD, em 28,8%.

Fonte: acervo pessoal.

Como já mencionado, em animais controles não foi possível a visualização dos ventrículos cerebrais na ultrassonografia transcraniana, o que impede a realização das medidas. A imagem de comparação entre um encéfalo de animal controle com um hidrocefálico pode ser observado na figura 22.

Figura 22 – Ultrassonografia transcraniana: controle X hidrocefálico

Figura 22: Comparação entre animal controle e animal hidrocefálico na ultrassonografia transcraniana. Em **A** observamos o encéfalo de um animal controle, sem expansão ventricular. Em **B**, encéfalo de um animal hidrocefálico, com clara visualização dos ventrículos laterais expandidos (seta). Em ambas as imagens os animais estavam com 13 dias de vida, referente ao P6, dia do primeiro exame ultrassonográfico.

Fonte: acervo do Laboratório de Proteção Cerebral na Infância

6.6. Análise histológica por hematoxilina-eosina

6.6.1. Corpo caloso

Foi possível observar que o corpo caloso (CC) dos grupos controles apresentava-se íntegro, extenso, com fibras lineares e camada endimária contínua caracterizada por um epitélio cúbico simples de núcleos celulares centralizados. Os animais HNT apresentavam o ventrículo lateral alargado, CC comprimido e estirado, com sinais de edema intercelular e rasgos vistos como espaçamento/esgarçamento entre suas fibras, além de comprometimento do epêndima de acordo com o tamanho ventricular. Em graus mais importantes de hidrocefalia, o epêndima era composto por células achatadas com pontos de rotura e desnudamento. Em casos de hidrocefalia gravíssima, o CC aparecia completamente destruído, especialmente na linha mediana do cérebro. Nos animais HTO, também observamos camada endimária descontinuada, porém, a população celular e as fibras do CC aparentam estar mais preservadas. Dentre os grupos derivados, não observamos diferenças estruturais evidentes. Ambos apresentavam população celular semelhante, algumas fibras comprimidas, porém, mais preservadas quando comparadas ao grupo sem tratamento e a camada endimária apresentava sinais de desnudamento em algumas regiões (fig. 23, fileira superior).

6.6.2. Córtex dorsal ao ventrículo lateral

A análise da citoarquitetura geral do córtex cerebral dorsal ao ventrículo lateral dos animais controles demonstrou a presença das seis camadas celulares corticais preservadas. Os animais hidrocefálicos tratados apresentavam a região do córtex com sua laminação preservada, porém, ligeiramente comprimida e com presença de algumas células picnóticas. Os animais HNT tinham o córtex um pouco mais comprimido que os demais grupos, maior número de células em processo de picnose, maior presença de rasgos e algumas células com aspecto espumoso (fig. 23, fileira média).

6.6.3. Matriz germinativa

Na região da matriz germinativa (MG), no ângulo externo do ventrículo lateral, foi visto que os grupos controles e o grupo HTO tinham população celular mais numerosa e os grupos HNT e HTD com a maior escassez de células presentes. Dentre os derivados, o grupo HTOD permaneceu com maior preservação da celularidade (fig. 23, fileira inferior).

6.6.4. Hipocampo

Os grupos controles apresentam estrutura hipocampal em espiral interna, em volta da fissura hipocampal, na parte inferomedial do lobo temporal. A formação hipocampal fica bem próxima ao corno temporal do ventrículo lateral, sem espaçamentos entre eles. Nos animais hidrocefálicos, com o aumento da ventriculomegalia, a formação hipocampal está sujeita a sofrer alterações estruturais importantes. No grupo HNT, os animais com grau de hidrocefalia moderada (classificação obtida após as mensurações através da UST) apresentaram as seguintes características: compressão látero-lateral e em sentido craniocaudal, inclinação de seu eixo, rasgos entre as subáreas, giro denteado descontínuo e/ou deslocado, densificação citoplasmática e morfologia nuclear alterada (núcleos direcionados à periferia). Na hidrocefalia grave, vimos que a compressão era ainda maior e, na hidrocefalia gravíssima, o hipocampo estava completamente desconfigurado. No grupo HTO, os animais com hidrocefalia leve, tinham o hipocampo morfológicamente normal, apenas um deles com leve afastamento das bordas da fissura hipocampal. Na hidrocefalia moderada, observamos leve compressão látero-lateral e craniocaudal e em um dos animais o hipocampo estava preservado. Na hidrocefalia grave e gravíssima, o hipocampo apresentou compressão craniocaudal mais acentuada do que no grupo HNT. No grupo HTD, tanto os animais com hidrocefalia leve quanto moderada apresentaram hipocampo com características normais e preservadas. Apenas um animal com hidrocefalia grave apresentou o hipocampo levemente comprimido, porém, com padrão estrutural próximo do normal. Por fim, no grupo HTOD, apenas um animal com hidrocefalia moderada apresentou estrutura diferente das demais, com aspecto “quadrado” e um animal com hidrocefalia grave com compressão craniocaudal, porém, com as subáreas preservadas. Assim, vemos que a descompressão pela derivação e a OHB permitiram maior preservação da formação hipocampal quando comparada ao grupo HNT. Os dados com os graus de hidrocefalia obtidos por grupo experimental podem ser observados na tabela 1 e o painel com as imagens das distorções no hipocampo como um todo podem ser observados na figura 24.

Figura 23 – Análise histológica por HE no corpo caloso

Figura 23: Fotomicrografias da análise por HE no corpo caloso (fileira superior), córtex dorsal ao ventrículo lateral (fileira média) e matriz germinativa (fileira inferior). Em todas as regiões foram encontradas algumas alterações teciduais, mas o grau de comprometimento foi maior no grupo HNT e um pouco mais ameno no grupo HTOD. Observa-se áreas de desnudamento celular no epêndima e na matriz germinativa (indicado por setas), pontos de rotura (indicados por asteriscos), células picnóticas (indicadas por círculos) e adelgaçamento das fibras do corpo caloso quando comparado aos controles. Na região cortical não vimos grandes alterações na laminação, apenas a presença células em picnose, o que pode ser observado em maior aumento na caixa em destaque nos grupos hidrocefálicos. Nos grupos controles, o aumento representa células com aspecto normal, com núcleo centralizado. Na matriz germinativa vemos que os grupos C, COHB, HTO e HTOD apresentam maior população celular (indicada por estrelas). VL= ventrículo lateral. Coloração: hematoxilina e eosina. Objetiva de 40x. Barra – 50 µm.

Fonte: acervo pessoal

Tabela 1 – Graus de hidrocefalia por grupo experimental

Tabela 1: graus de expansão ventricular obtidos em cada grupo experimental. Não observamos nenhum caso de hidrocefalia leve no grupo sem tratamento e sem casos graves e gravíssimos nos grupos derivados.

Grau/ID	HNT	HTO	HTD	HTOD
Leve	0	2	4	2
Moderado	6	6	4	6
Grave	2	1	2	2
Gravíssimo	2	1	0	0

Fonte: acervo pessoal.

Quando avaliamos o IP% nas subáreas hipocâmpais, observamos que, de modo geral, todos os grupos hidrocefálicos apresentaram células em picnose, porém, os grupos que receberam tratamentos tinham essa taxa visivelmente menor do que o grupo HNT. Traumas teciduais como rasgos, pontos de rotura, células com aspecto espumoso e espaçamento entre células foram observados em ambos os grupos, mas em maior intensidade no grupo HNT. O painel com as fotomicrografias e análises estatísticas pode ser visto na figura 25. Em CA1 vemos que o grupo HNT apresentou porcentagem de 60,7% ($\pm 28,5$) de neurônios em picnose, enquanto os grupos HTO, HTD e HTOD apresentaram 40,7% ($\pm 14,3$), 34,6% ($\pm 10,2$) e 29,2% ($\pm 13,2$), respectivamente. Diferenças observadas entre os grupos HNT e HTOD ($p=0,01$). O mesmo padrão observado em CA1, também foi visto em CA2. O IP% encontrado nesta região no grupo HNT foi de 68% ($\pm 20,1$), HTO: 48,1% (± 25), HTD 41% ($\pm 6,8$) e HTOD 32,3% ($\pm 13,5$), diferenças encontradas entre HNT e os grupos HTD e HTOD ($p<0,05$). Em CA3, os resultados obtidos foram: HNT: 53,1% ($\pm 18,2$), HTO 36,2% (± 15), HTD 33,6% ($\pm 11,1$) e HTOD 32,2% ($\pm 9,2$). Diferenças notadas entre HNT e os grupos HTO e HTOD ($p<0,05$). Por fim, na análise do giro denteado, os resultados encontrados foram: HNT 46,3% ($\pm 12,8$), HTO 31,2% ($\pm 8,8$), HTD 32,5% ($\pm 20,2$) e HTOD 23,5% ($\pm 9,3$). Diferenças encontradas entre o grupo HNT com os grupos HTO e HTOD ($p<0,05$). Em síntese, o grupo sem tratamento apresenta maior índice de picnose – maior degeneração celular – que os demais grupos e o grupo HTOD apresenta porcentagens mais baixas que os demais grupos, inclusive do grupo tratado apenas com a derivação.

Figura 24 – alterações estruturais encontradas no hipocampo

Figura 24: Fotomicrografias do hipocampo e suas alterações. Animais dos grupos C e COHB apresentam estrutura normal. Para os grupos hidrocefálicos foram selecionadas imagens do hipocampo no grau moderado de hidrocefalia, presente em todos os grupos. Observa-se rasgos, descontinuação tecidual (*) em especial no grupo HNT, assim como a compressão látero-lateral. Animais dos grupos HTO, HTD e HTOD apresentam estruturação semelhante aos controles. VL= ventrículo lateral. Coloração: hematoxilina e eosina. Objetiva de 4x. Barra – 100 μm

Fonte: acervo pessoal.

Figura 25 – Análise do IP% nas subáreas hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e GD

Figura 25: Fotomicrografias e seus respectivos gráficos do índice de picnose nas subáreas hipocâmpais (CA1, CA2, CA3 e GD). Animais HNT apresentaram maior quantidade de células neurais em processo de degeneração ($p < 0,05$). Células picnóticas apontadas por setas. Coloração: HE. Objetiva: 40x. 50 μ m.

Fonte: acervo pessoal.

6.7. Análise histológica por luxol fast blue

Através da análise por LFB podemos observar que o grupo hidrocefálico sem tratamento foi o que apresentou a menor espessura do corpo caloso $41,8 \mu\text{m}$ ($\pm 16,6$). Dentre os grupos hidrocefálicos tratados, o grupo HTO apresentou espessura média de $60,8 \mu\text{m}$ (± 17), HTD $62,7 \mu\text{m}$ ($\pm 22,3$) e HTOD $63,2 \mu\text{m}$ ($\pm 22,3$). O grupo C apresentou espessura média de $94 \mu\text{m}$ ($\pm 14,3$) e o grupo COHB $85,5 \mu\text{m}$ ($\pm 10,9$). Diferenças foram observadas entre o grupo C (com corpo caloso mais espesso) e todos os grupos hidrocefálicos ($p < 0,05$) e entre os grupos COHB e HNT (com a menor espessura encontrada) ($p < 0,0001$). Quanto à intensidade da cor azul, o grupo HNT foi o que apresentou a menor tonalidade $0,9$ ($\pm 0,7$). Os demais grupos ficaram com tonalidades mais próximas, sendo: C $1,5$ ($\pm 0,5$), COHB $1,5$ ($0,5$), HTO $1,4$ ($\pm 0,6$), HTD $1,1$ ($\pm 0,7$) e HTOD $1,4$ ($\pm 0,6$). Nota-se que, dentre os grupos hidrocefálicos tratados, o grupo HTD foi o que apresentou a menor tonalidade de azul encontrada. Os gráficos referentes à espessura do CC e o grau de tonalidade na cor azul podem ser observados na figura 26 e as fotomicrografias na figura 27.

Figura 26 – Gráficos da espessura e tonalidade de azul no corpo caloso

Figura 26: Gráficos representando a espessura do corpo caloso em milímetros e a tonalidade da cor azul. Os animais controles apresentam maior espessura do CC quando comparados aos grupos hidrocefálicos ($p < 0,05$) e maior tonalidade de azul. O grupo HNT mostra a menor espessura registrada ($41,8 \mu\text{m}$) e a tonalidade mais baixa. E os grupos HTO e HTOD com tonalidade azul mais forte que o grupo HTD, o que sugere maior preservação do conteúdo de mielina quando aplicada a OHB.

Fonte: acervo pessoal.

Figura 27 – Análise por LFB no corpo caloso

Figura 27: Fotomicrografias da tonalidade da cor azul e espessura do corpo caloso (barra branca): Observa-se maior espessura dos grupos controles, seguidos dos grupos derivados e, com o maior comprometimento, o grupo HNT. Região azul delimita o local onde há a presença de mielina e em roxo, as regiões amielínicas. CTX= Córtex dorsal ao corpo caloso; VL= ventrículo lateral. Objetiva de 40x. Barra – 100 µm.

Fonte: acervo pessoal.

6.8. Análises imunoistoquímicas

6.8.1. GFAP

Na região do corpo caloso observamos que os animais C e COHB apresentaram astrócitos reativos em menor quantidade $16 (\pm 11,7)$ e $14,3 (\pm 12)$, respectivamente. Dentre os grupos hidrocefálicos, vemos alta expressão da proteína GFAP nos grupos tratados cirurgicamente, com diferenças dos demais grupos ($p < 0,05$). O grupo HTD apresentou taxa de marcação média de $51,8 (\pm 25,3)$ e o grupo HTOD, ligeiramente mais baixa, de $48,2 (\pm 17,3)$. Nos grupos hidrocefálicos sem cirurgia, o grupo HNT apresentou a maior taxa de marcação $29,7 (\pm 9,7)$ e, em seguida, o grupo HTO $26,7 (\pm 9,6)$. Quando avaliamos o escore de intensidade de marcação, vemos que todos os grupos que foram tratados com a OHB apresentaram níveis menores de intensidade. Entre os grupos controles, o grupo C apresentou escore de intensidade médio de $1,3 (\pm 0,4)$ e o grupo COHB $1 (\pm 0,3)$. Dentre os grupos hidrocefálicos sem cirurgia, o grupo HNT apresentou escore médio de $2 (\pm 0,5)$ e o grupo HTO $1,3 (\pm 0,4)$, diferença entre ambos de $p = 0,01$. Já entre os grupos cirúrgicos, os animais HTD apresentaram escore médio de $2,5 (\pm 0,4)$ e o grupo HTOD de $2,2 (\pm 0,4)$, com diferenças dos demais grupos ($p < 0,05$). Os gráficos referentes à densidade de marcação e escore de intensidade podem ser observados na figura 28A e B.

Figura 28 – Análise da marcação para GFAP no corpo caloso

Figura 28: Gráficos referentes à imunomarcação da proteína GFAP na região do corpo caloso. Em **A**, número de astrócitos reativos por mm², destaque para os grupos tratados cirurgicamente, com maior média de imunomarcação e em **B**, escore de intensidade de marcação, em que os grupos HNT, HTD e HTOD foram os que apresentaram as maiores notas.

Fonte: acervo pessoal.

Na análise da densidade de astrócitos por mm² na região do córtex dorsal ao ventrículo lateral observamos que o grupo C apresentou média de marcação de 4,7 ($\pm$ 1,1) e escore médio de intensidade de 0,9 ($\pm$ 0,1). Grupo COHB com 2 ($\pm$ 0,7) astrócitos reativos por mm² e escore médio de 0,6 ($\pm$ 0,1). Ambos os grupos controles com intensidade classificada entre 0 (sem astrogliose reativa) e 1 (astrócitos reativos com prolongamentos finos e delicados). Dentre os grupos hidrocefálicos sem derivação liquórica, o grupo HNT apresentou maior quantidade de astrócitos por mm² 7,4 ($\pm$ 1,6) e escore 0,9 ($\pm$ 0,1), enquanto o grupo HTO apresentou 3,1 ($\pm$ 1,3) astrócitos reativos por mm² e escore médio de 0,4 ($\pm$ 0,1). Ambos com classificação de intensidade entre 0 e 1, sendo o grupo HNT o mais próximo de 1. Já nos grupos tratados com derivação liquórica, o grupo HTD foi o que apresentou maior marcação 27,6 ($\pm$ 6,6), com média de intensidade de 1,9 ($\pm$ 0,3). O grupo HTOD apresentou menor número de células marcadas 18,7 ($\pm$ 4,6) e escore de 1,8 ($\pm$ 0,2). Ambos foram classificados com intensidade entre 1 e 2 (astrócitos reativos com prolongamentos moderadamente grossos). Alguns animais do grupo HTD registraram o escore 3 (astrócitos reativos, fortemente marcados, com prolongamentos muito grossos), o que contribuiu para maiores valores de intensidade. Os gráficos da densidade e intensidade da reação astrocitária podem ser observados na figura 29. Quanto à densidade, diferenças foram encontradas do grupo COHB com os grupos HTD e HTOD ($p < 0,05$) e entre HTO e HTD ($p = 0,01$). Já no escore médio de intensidade, diferenças foram encontradas entre o grupo HTO e os grupos HTD e HTOD ($p < 0,05$).

Figura 29 - Densidade e intensidade astrocitária no córtex dorsal ao ventrículo lateral

Figura 29: Gráficos da imunomarcção de GFAP no córtex dorsal ao ventrículo lateral. Em **A**, densidade de astrócitos encontrados por mm² e em **B**, escore de intensidade de marcação, sendo: 0- sem astrócitos reativos, 1- astrócitos reativos com prolongamentos finos e delicados, 2- astrócitos reativos com prolongamentos moderadamente grossos e 3- astrócitos reativos, fortemente marcados, com prolongamentos muito grossos. O grupo HTD foi o que apresentou o maior número e a maior intensidade registrada.

Fonte: acervo pessoal.

A densidade e a intensidade de marcação de astrócitos por mm² no hipocampo não mostraram diferenças. A análise foi feita a partir das camadas hipocâmpais de CA1 e do giro denteado. Em CA1, nas camadas oriens, piramidal e molecular, os grupos HNT e HTD apresentaram a maior quantidade de astrócitos por mm² 9 ($\pm$ 4) e 10 ($\pm$ 5,9), respectivamente, e maior intensidade, classificados como astrócitos reativos de prolongamentos moderados e muito grossos. Já os grupos C, COHB e HTO, apresentaram médias de marcação bem semelhantes, com 7,8 ($\pm$ 3,4), 7 ($\pm$ 3) e 7 ($\pm$ 2,8) respectivamente, e níveis de intensidade entre 1 e 2. Já o grupo HTOD foi o que apresentou o menor número de astrócitos reativos, com média de 5,3 ($\pm$ 3,4) e menor intensidade, com astrócitos finos e delicados.

No GD, na camada molecular, os animais tratados com OHB apresentaram números inferiores de astrócitos reativos quando comparados aos grupos sem o tratamento. Na camada granular, em geral, o número de astrócitos encontrados foi baixo. Os grupos HNT e HTO apresentaram 9 ($\pm$ 5,5) e 7,8 ($\pm$ 3,3) respectivamente, enquanto os demais grupos tinham em torno de 4,5 a 5,6 astrócitos reativos por mm². O escore de intensidade ficou próximo de 1 para ambos os grupos. A camada polimorfa foi onde encontramos a maior taxa de astrogliose reativa. As médias encontradas foram: C 12,7 ($\pm$ 5,4), COHB 10,6 ($\pm$ 4), HNT 14 ($\pm$ 4,3), HTO 13,7 ($\pm$ 5,4), HTD 13,8 ($\pm$ 6,7) e HTOD 12,7 ($\pm$ 5). Os grupos que receberam o tratamento hiperbárico, também apresentaram menor intensidade quando comparados aos grupos sem OHB. Os grupos hidrocefálicos, no geral, apresentaram intensidade próxima ao escore 2, com destaque para os grupos HNT e HTD e os grupos controles com escore próximo de 1. Os gráficos de densidade e intensidade de ambas as regiões podem ser vistos na figura 30 e todas as fotomicrografias da imunoistoquímica para GFAP no hipocampo foram agrupadas em um painel e podem ser observadas na figura 31.

Figura 30 – Astroglíose reativa nas subáreas hipocâmpais CA1 e giro denteado

Figura 30: Gráficos da taxa de marcação e intensidade de GFAP nas camadas CA1 e giro denteado do hipocampo. Em ambas as regiões, observa-se que os grupos HNT e HTD foram os que mais apresentaram marcação, tanto na densidade, quanto no escore de intensidade. E os grupos HTO e HTOD com os menores valores registrados, mas não foram observadas diferenças.

Fonte: acervo pessoal.

Figura 31 - Imunomarcção por GFAP no corpo caloso, córtex dorsal ao ventrículo lateral e nas subáreas hipocâmpais CA1 e giro denteado

Figura 31: Fotomicrografias de lâminas imunomarcadas com GFAP no corpo caloso (fileira superior), córtex dorsal ao ventrículo lateral (segunda fileira) e subáreas hipocâmpais CA1 (terceira fileira) e GD (fileira inferior). Em ambas as regiões, os grupos C, COHB e HTO apresentaram menor intensidade de marcação. O grupo HNT apresentou mais astrócitos reativos e maior intensidade que os controles e o grupo HTO. Já os grupos derivados apresentaram a maior quantidade e intensidade de reação astrocitária, porém, o grupo HTOD mostra reação mais amena. Exemplos de astrócitos reativos com prolongamentos finos e delicados (seta grossa), astrócitos reativos com prolongamentos moderadamente grossos (asterisco) e astrócitos reativos, fortemente marcados, com prolongamentos muito grossos (seta fina) em maior aumento podem ser observados na caixa em destaque na região do córtex dorsal ao VL. ORI= camada oriens, PIR: camada piramidal, MOL: camada molecular, GRA: camada granular, POL: camada polimorfa. VL: ventrículo lateral. Objetiva 40x. Barra: 100 µm.

Fonte: acervo pessoal.

6.8.2. Ki-67

Na região da MG, no ângulo externo do ventrículo lateral, os grupos C e COHB apresentaram a maior população celular total e a maior quantidade de células imunomarcadas por Ki-67. O grupo C mostrou média de 273,6 células totais e 56,6 células positivas e o grupo COHB média de 264 células totais e 49,4 marcadas. Dentre os grupos hidrocefálicos que não foram submetidos ao tratamento cirúrgico, vemos que o grupo HNT apresentou a menor quantidade de células imunomarcadas (8,5) e também a menor população celular (124,9) e o grupo HTO mostrou maior quantidade média de células, tanto marcadas (16,8), quanto totais (149). Dentre os grupos derivados, o grupo HTD apresentou menos células marcadas (27,8) e totais (190,6) que o grupo HTOD (41,8 positivas e 235,1 totais), médias semelhantes às obtidas pelos grupos controles. Diferenças foram observadas entre os grupos C, COHB e HTOD que apresentam mais células positivas e totais quando comparado aos grupos HNT e HTO ($p < 0,05$). Também constatamos diferenças entre os grupos C e HTD, com maior marcação e população celular do grupo controle e entre os grupos HTD e HNT, sendo o grupo sem tratamento o que apresentou a menor quantidade de células ($p < 0,05$) (fig. 32). Os dados obtidos podem ser observados na tabela 2 e as fotomicrografias na figura 33.

Figura 32 – Imunomarcação para Ki-67 na matriz germinativa

Figura 32: Gráficos da imunomarcação para Ki-67 na matriz germinativa. Nota-se que os grupos controles e o grupo HTOD foram os que apresentaram a maior quantidade de células positivas para Ki-67 e maior população celular, ao contrário do grupo HNT ($p < 0,05$).

Fonte: acervo pessoal.

Tabela 2 – Imunomarcação de Ki-67 na matriz germinativa

Tabela 2: Proporção de células imunomarcadas pelo anticorpo Ki-67 na matriz germinativa. Os grupos controles apresentam maior quantidade de células positivas e totais, com maior proporção celular que os outros grupos. Dentre os grupos hidrocefálicos que receberam tratamento, o grupo HTOD foi o que teve média de células positivas e totais mais próximas aos grupos controles, ao contrário do grupo sem tratamento, com as menores médias encontradas.

Grupos	Células positivas (CP)	Células totais (CT)	CP/CT*100
C	56,6 (± 25,8)	273,6 (± 93,2)	20,6 (± 25,7)
COHB	49,4 (± 26,8)	264 (± 62,4)	18,7 (±17,54)
HNT	8,5 (± 9,8)	124,9 (± 34)	6,8 (± 6,81)
HTO	16,8 (± 14,6)	149 (± 38,3)	11,2 (± 7,49)
HTD	27,8 (± 15,4)	190,6 (± 69,1)	14,6 (± 12,05)
HTOD	41,8 (± 25,7)	235,1 (± 68,4)	17,7 (± 17,91)

Fonte: acervo pessoal

Figura 33 – Avaliação para Ki-67 na matriz germinativa

Figura 33: Fotomicrografias da MG para Ki-67. Células em processo de replicação apontadas por setas. Grupos controles e tratados com maior número de células marcadas e totais, ao contrário do grupo HNT com maior área de desnudamento e poucas células imunomarcadas. Objetiva de 40x. Barra 100µm.

Fonte: acervo pessoal.

6.8.3. Caspase-3

Os gráficos da análise do corpo caloso e do córtex dorsal ao ventrículo lateral podem ser observados na figura 34 e suas fotomicrografias na figura 35. O número de células encontradas em processo de apoptose no corpo caloso foi de: C 9 (± 4), COHB 8,9 ($\pm 4,7$), HNT 14,9 ($\pm 3,1$, com o maior número de células imunomarcadas), HTO 11,2 ($\pm 3,8$), HTD 8,9 ($\pm 4,4$) e HTOD 7,6 ($\pm 1,9$, grupo com o menor número de células em processo de apoptose). Apesar destes achados, não observamos diferenças entre os grupos nesta região. No córtex dorsal ao ventrículo lateral, o número de células encontradas em apoptose foi significativamente maior no grupo HNT 41,1 ($\pm 26,5$) ($p < 0,05$). Os resultados encontrados nos demais grupos foram: C 9,5 ($\pm 4,7$), COHB 8,8 ($\pm 4,6$), HTO 8 ($\pm 2,6$), HTD 14,6 ($\pm 10,3$) e HTOD 11,8 ($\pm 4,1$).

Figura 34 – Caspase-3 no corpo caloso e no córtex dorsal ao ventrículo lateral

Figura 34: Gráficos da imunomarcção para caspase-3. No corpo caloso, observa-se maior quantidade de células em apoptose no grupo HNT e a menor quantidade no grupo HTOD, porém, não foram observadas diferenças. Já na região do córtex dorsal ao ventrículo lateral, observa-se diferença significativa do grupo HNT com todos os demais grupos ($p < 0,05$).

Fonte: acervo pessoal.

Figura 35 – Imunomarcção para caspase-3 no corpo caloso e no córtex dorsal ao ventrículo lateral

Figura 35: Fotomicrografias da análise de imunomarcção para caspase-3 no corpo caloso e no córtex dorsal ao ventrículo lateral. Nota-se maior taxa de células imunomarcadas em processo de apoptose no grupo HNT e menor no grupo HTOD (setas). VL= ventrículo lateral. Objetiva: 40x. Barra: 100 µm.

Fonte: acervo pessoal.

6.8.4. COX-2

A análise imunoistoquímica por COX-2 foi feita em várias regiões diferentes com o objetivo de observar áreas afetadas pela neuroinflamação. Em todas as áreas avaliadas, observamos que o grupo HNT apresentou a maior quantidade de células imunomarcadas. Todas as médias e desvios padrão encontrados podem ser observados na tabela 3 e os gráficos correspondentes na figura 36.

No corpo caloso, o grupo HNT apresentou a maior porcentagem de marcação (40,8%), enquanto os grupos que receberam tratamentos apresentaram porcentagens inferiores (HTO 27,9%, HTD 26,5% e HTOD 24,2%). O grupo HTOD foi o que mais se aproximou dos grupos controles (C 24,2% e COHB 23,6%), porém, não foram observadas diferenças, assim como também observado na região do córtex dorsal ao ventrículo lateral. Nesta região, um mesmo padrão de marcação foi observado, com maior quantidade de células imunomarcadas no grupo HNT (55,5%) e animais controles e hidrocefálicos tratados com menos células positivadas. Já no córtex dorsal ao hipocampo, observamos diferença entre o grupo HNT (49,1%) e os grupos C (30,1%) e COHB (31,2%) ($p=0,02$). Os grupos hidrocefálicos tratados também apresentaram menor quantidade de células positivas, sendo: HTO (36,7%), HTD (32,8%) e HTOD (31,1%). As fotomicrografias referentes a essas regiões encontram-se na figura 37.

No hipocampo, em CA1, observamos diferença entre o grupo HNT (39,5%), com maior porcentagem de marcação, e o grupo HTOD (19,3%), com menos células positivadas ($p=0,01$). Em CA2, não observamos diferenças, apenas a maior quantidade de células marcadas no grupo HNT (57,6%). Já em CA3, diferenças foram observadas entre o grupo HNT e os grupos C, COHB, HTO e HTOD ($p<0,05$). No giro denteado, não observamos diferenças, apenas a maior marcação do grupo HNT (33,8%). Na última região analisada, a matriz germinativa, também não foram observadas diferenças, apenas a maior porcentagem de células positivas para o grupo HNT (11%). Baseado nestes resultados, vemos que a hidrocefalia também gera o aumento da neuroinflamação via COX-2 e a OHB promove efeito anti-inflamatório, reduzindo a porcentagem de marcação nas áreas avaliadas. As fotomicrografias referentes a essas regiões encontram-se na figura 38.

Tabela 3 – Imunomarcção para COX-2 em diferentes regiões cerebrais

Tabela 3: Porcentagem de marcação em diferentes regiões cerebrais para COX-2. Diferenças encontradas: *HNT e os grupos C e COHB ($p=0,02$) na região córtex cerebral posterior ao hipocampo; †HNT e HTOD ($p=0,01$) na subárea hipocampal CA1; ‡HNT e os grupos C, COHB, HTO e HTOD ($p<0,05$) na subárea hipocampal CA3. Nas demais regiões, apesar de vermos que os grupos hidrocefálicos tratados exibiram menor expressão de COX-2, não houveram diferenças constatadas.

ID	Áreas							
	CC	Ctx VL	Ctx Hip	CA1	CA2	CA3	GD	MG
	% (dp)	% (dp)	% (dp)	% (dp)	% (dp)	% (dp)	% (dp)	% (dp)
C	24,24 ($\pm 14,67$)	42,86 ($\pm 8,82$)	30,13 ($\pm 4,62$)	20,95 ($\pm 11,05$)	41,47 ($\pm 4,03$)	44,95 ($\pm 11,67$)	23,52 ($\pm 9,10$)	7,84 ($\pm 6,53$)
COHB	23,62 ($\pm 5,50$)	39,96 ($\pm 7,31$)	31,22 ($\pm 6,30$)	20,64 ($\pm 8,72$)	35,92 ($\pm 14,63$)	46,95 ($\pm 11,03$)	22,97 ($\pm 3,25$)	5,28 ($\pm 4,29$)
HNT	40,88 ($\pm 11,5$)	55,53 ($\pm 9,19$)	49,10 ($\pm 6,81$) *	39,57 ($\pm 10,86$) †	57,68 ($\pm 15,33$)	74,10 ($\pm 5,95$) ‡	33,80 ($\pm 15,74$)	11,03 ($\pm 8,40$)
HTO	27,95 ($\pm 17,24$)	47,16 ($\pm 9,32$)	36,73 ($\pm 14,46$)	30,19 ($\pm 14,22$)	44,22 ($\pm 15,81$)	50,47 ($\pm 9,17$)	32,06 ($\pm 14,98$)	9,22 ($\pm 7,96$)
HTD	26,51 ($\pm 17,27$)	44,31 ($\pm 19,95$)	32,85 ($\pm 8,22$)	20,66 ($\pm 15,08$)	43,93 ($\pm 13,85$)	54,76 ($\pm 8,94$)	24,25 ($\pm 17,11$)	8,45 ($\pm 5,76$)
HTOD	24,29 ($\pm 15,25$)	40,44 ($\pm 16,04$)	31,17 (8,64)	19,31 ($\pm 12,96$)	35,42 ($\pm 19,82$)	47,97 ($\pm 11,22$)	23,64 ($\pm 8,33$)	7,88 ($\pm 6,59$)

Fonte: acervo pessoal.

Figura 36 – Gráficos da análise para COX-2 em diferentes regiões cerebrais

Figura 36: Gráficos referentes à análise por COX-2 em diferentes regiões cerebrais. Em todas as regiões o grupo HNT foi o que mais expressou o imunomarcador. Diferenças significativas encontradas no córtex dorsal ao hipocampo entre o grupo HNT e os grupos controles, em CA1 entre os grupos HNT e HTOD e na região de CA3, entre o grupo HNT e os grupos C, COHB, HTO e HTOD ($p < 0,05$).

Fonte: acervo pessoal.

Figura 37 – Análise por COX-2 no corpo caloso, córtex dorsal ao ventrículo lateral, matriz germinativa e córtex dorsal ao hipocampo

Figura 37: Fotomicrografias da imunomarcção para COX-2 no corpo caloso, córtex dorsal ao ventrículo lateral, matriz germinativa e córtex dorsal ao hipocampo. Em cada área, nota-se maior quantidade de células imunomarcadas no grupo HNT, ao contrário do grupo HTOD, com esparsas marcações (setas). Objetiva: 40x. Barra 100 µm.

Fonte: acervo pessoal.

Figura 38 – Análise por COX-2 nas subáreas hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e giro denteado

Figura 38: Fotomicrografias da imunomarcagem para COX-2 nas subáreas hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e giro denteado. Em cada área, nota-se maior quantidade de células imunomarcadas no grupo HNT, ao contrário do grupo HTOD, com esparsas marcações (setas). A região de CA3 aparenta ser o maior alvo da COX-2. Objetiva: 40x. Barra 100 µm.

Fonte: acervo pessoal.

6.8.5. NeuN

No córtex dorsal ao ventrículo lateral, a média da densidade celular encontrada foi de: HNT 31,5 ($\pm 5,6$), HTO 34,6 ($\pm 5,1$), HTD 29,8 ($\pm 5,5$) e HTOD 32,8 ($\pm 7,5$). A porcentagem de neurônios positivos foi: HNT 58,4% ($\pm 6,4$), HTO 58,8% ($\pm 4,9$), HTD 60,7% ($\pm 5,2$) e HTOD 64,9% ($\pm 7,8$). E a intensidade de marcação obtida foi: HNT 2 ($\pm 0,6$), HTO 3, HTD 2,5 ($\pm 0,5$) e HTOD 2,8 ($\pm 0,1$). Diferença encontrada apenas no escore de intensidade entre o grupo HNT, com menor escore e HTO, com o maior ($p=0,008$). No córtex dorsal ao hipocampo a densidade encontrada foi: HNT 29 ($\pm 4,1$), HTO 35,8 (± 6), HTD 29 ($\pm 9,7$) e HTOD 32,8 ($\pm 5,2$). A porcentagem de neurônios positivos foi: HNT 61,9% ($\pm 9,3$), HTO 63,5% ($\pm 4,4$), HTD 63,7% ($\pm 6,8$) e HTOD 67,6% ($\pm 12,6$). E a intensidade de marcação obtida foi: HNT 2,1 ($\pm 0,5$), HTO 3, HTD 2,8 ($\pm 0,1$) e HTOD 2,9 ($\pm 0,1$). Diferença encontrada apenas no escore de intensidade entre o grupo HNT, com menor escore, e HTO com o maior ($p=0,02$). Os gráficos referentes a estas regiões podem ser vistos na figura 39 (1ª e 2ª fileira) e as fotomicrografias na figura 40.

Nas subáreas hipocâmpais, em CA1, média da densidade celular encontrada foi: HNT 37,2 ($\pm 9,2$), HTO 43,5 ($\pm 2,6$), HTD 44,7 ($\pm 18,9$) e HTOD 41,1 ($\pm 10,8$). Porcentagem de neurônios positivos: HNT 73,3% ($\pm 4,4$), HTO 74,7% ($\pm 5,7$), HTD 76,2% (± 8) e HTOD 67,9% ($\pm 9,4$). Intensidade: HNT 2,3 ($\pm 0,5$), HTO 2,8 ($\pm 0,1$), HTD 2,2 ($\pm 0,8$) e HTOD 2,8 ($\pm 0,2$). Em CA2, média da densidade celular foi: HNT 34,1 ($\pm 8,1$), HTO 39,7 ($\pm 11,5$), HTD 37,7 ($\pm 11,5$) e HTOD 44,9 (± 11). Porcentagem de neurônios positivos: HNT 67,4% ($\pm 5,5$), HTO 67,5% ($\pm 7,5$), HTD 70% ($\pm 4,7$) e HTOD 69,2% ($\pm 13,7$). Intensidade: HNT 2,1 ($\pm 0,6$), HTO 2,1 ($\pm 0,7$), HTD 1,9 ($\pm 0,6$) e HTOD 2,4 ($\pm 0,2$). Tanto em CA1, quanto em CA2 não foram observadas diferenças entre os grupos. Em CA3, a média da densidade celular foi: HNT 26,5 ($\pm 6,5$), HTO 31,9 ($\pm 3,44$), HTD 27,1 ($\pm 2,5$) e HTOD 28,3 ($\pm 4,2$). Porcentagem de neurônios positivos: HNT 57,5% ($\pm 6,7$), HTO 59,5% (± 3), HTD 71,8% ($\pm 7,9$) e HTOD 66,8% ($\pm 4,6$). Intensidade: HNT 1,7 ($\pm 0,4$), HTO 2,4 ($\pm 0,4$), HTD 2,1 ($\pm 0,8$) e HTOD 2,3 ($\pm 0,5$). Diferença encontrada entre os grupos HNT (com menos células positivas) e HTD na quantidade de células marcadas ($p=0,04$). Por fim, no GD, a média da densidade celular foi: HNT 59,7 ($\pm 12,4$), HTO 77,6 ($\pm 18,4$), HTD 63 ($\pm 15,3$) e HTOD 91,8 ($\pm 60,3$). Porcentagem de neurônios positivos: HNT 73,4% ($\pm 9,4$), HTO 71% ($\pm 12,5$), HTD 81,7% ($\pm 3,3$) e HTOD 79,4% ($\pm 4,2$). Intensidade: HNT 2 ($\pm 0,4$), HTO 2,2 ($\pm 0,5$), HTD 2,3 ($\pm 0,4$) e HTOD 2,8 ($\pm 0,2$), sem diferenças encontradas nessa região. Os gráficos referentes às subáreas hipocâmpais podem ser encontrados na figura 39 (3ª a 6ª fileira) e as fotomicrografias na figura 41.

Figura 39 – Gráficos da avaliação por NeuN em diferentes regiões cerebrais

Figura 39: Gráficos da imunomarcagem pelo anticorpo NeuN em diferentes regiões cerebrais. Primeira coluna refere-se à densidade celular encontrada (nº total de neurônios/área), em que vemos maior população neuronal nos grupos tratados. Na segunda coluna encontramos a porcentagem de células positivas para NeuN, nota-se que todos os grupos apresentaram alta porcentagem, diferença significativa apenas em CA3 entre os grupos HNT e HTD ($p=0,04$). A terceira coluna refere-se à intensidade de marcação e podemos observar que os grupos HTO e HTOD apresentam valores ligeiramente maiores que os demais grupos.

Figura 40 – Imunomarcção por NeuN no córtex dorsal ao ventrículo lateral e no córtex dorsal ao hipocampo

Figura 40: Fotomicrografias da análise por NeuN no córtex dorsal ao ventrículo lateral (fileira superior) e no córtex dorsal ao hipocampo (fileira inferior). A primeira coluna, fotografada na objetiva de 4x, indica a região em que as fotomicrografias representativas foram tiradas. Nas demais colunas, observamos o padrão de imunomarcção de NeuN de acordo com os grupos experimentais. Nota-se que em ambos os grupos há grande quantidade de células positivas para NeuN, porém, na avaliação da intensidade, o grupo HNT apresentou o menor escore (intensidade mais clara da cor marrom) e os grupos HTO e HTOD apresentam coloração marrom ligeiramente mais forte, mas diferenças significativas não foram observadas nestas regiões. Objetiva de 40x. Barra: 100 μ m.

Fonte: acervo pessoal.

Figura 41 - Imunomarcção por NeuN nas subáreas hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e GD

Figura 41: Fotomicrografias da análise por NeuN nas subáreas hipocâmpais. A primeira coluna, fotografada na objetiva de 4x, indica a região em que as fotomicrografias representativas foram tiradas. Nas demais colunas, observamos o padrão de imunomarcção para NeuN. Nota-se que em ambos os grupos há grande quantidade de células positivas para NeuN, porém, na avaliação da intensidade, o grupo HNT apresentou o menor escore (intensidade mais clara da cor marrom) e os grupos tratados apresentam coloração marrom mais forte. Objetiva de 40x. Barra: 100 μ m.

Fonte: acervo pessoal

6.8.6. SOD1

No córtex dorsal ao ventrículo lateral, não observamos diferenças entre os grupos, apenas uma menor porcentagem de marcação no grupo HNT 16,7% ($\pm 17,6$), enquanto os outros grupos registraram porcentagens de: C 27,7% ($\pm 11,5$), COHB 25,7% (± 4), HTO 24,8% ($\pm 11,8$), HTD 20% ($\pm 7,7$) e HTOD 23,7% ($\pm 8,5$). Na análise da intensidade de marcação, o grupo HNT também foi o que apresentou a menor numeração 0,9 ($\pm 0,5$), enquanto os demais grupos mostraram maiores valores de intensidade: C 1,7 ($\pm 0,2$), COHB 1,8 ($\pm 0,5$), HTO 1,8 ($\pm 0,6$), HTD 1,6 ($\pm 0,2$) e HTOD 1,8 ($\pm 0,7$), mas sem diferenças encontradas. Na avaliação do córtex dorsal ao hipocampo, encontramos diferenças do grupo COHB (com mais células marcadas) com os grupos HNT e HTD ($p < 0,05$). As porcentagens encontradas foram: C 21,6% ($\pm 8,6$), COHB 24,9% ($\pm 5,4$), HNT 7,9% (± 10), HTO 16,7% ($\pm 7,9$), HTD 10,7% ($\pm 4,9$) e HTOD 19,5% ($\pm 6,4$). Quanto a intensidade de marcação, apesar do menor valor atribuído ao grupo HNT, novamente não observamos diferenças. Os valores encontrados foram: C 1,7 ($\pm 0,1$), COHB 1,8 ($\pm 0,6$), HNT 1 ($\pm 0,4$), HTO 1,6 ($\pm 0,4$), HTD 1,6 ($\pm 0,7$) e HTOD 2 ($\pm 0,7$). Já na análise da subárea hipocampal CA1, observamos diferenças entre os grupos C e HNT ($p = 0,03$), COHB e os grupos HNT, HTO e HTD ($p < 0,05$) e entre os grupos HTOD e HNT ($p = 0,04$). Os grupos C, COHB e HTOD apresentaram as maiores porcentagens de marcação. Os valores encontrados foram: C 16% ($\pm 6,8$), COHB 19,5% ($\pm 10,3$), HNT 3,2% ($\pm 4,9$), HTO 6,6% ($\pm 2,9$), HTD 6,7% (± 3) e HTOD 15,6% ($\pm 6,9$). Na análise da intensidade de marcação, observamos diferenças entre os grupos HNT (com a menor intensidade de marcação) e os grupos HTO e HTOD ($p < 0,05$), com maior intensidade. Os escores de intensidade encontrados foram: C 1,3 ($\pm 0,5$), COHB 1,8 ($\pm 0,9$), HNT 0,4 ($\pm 0,5$), HTO 2,4 ($\pm 0,5$), HTD 2 ($\pm 0,7$) e HTOD 2,5 ($\pm 0,8$). Os gráficos gerados podem ser observados na figura 42 e as fotomicrografias referentes a estas três regiões avaliadas podem ser vistas na figura 43.

Em resumo, é possível observar que a hidrocefalia e seus acometimentos secundários geram o aumento do estresse oxidativo e das ERO's, visto que a superóxido dismutase, enzima varredora de radicais livres, encontra-se reduzida no grupo sem tratamento. Tal condição gera efeitos citotóxicos e prejudiciais ao tecido encefálico. A DVS isolada não foi suficiente para aumentar a SOD1, mas a associação dos dois tratamentos sim. Todos os grupos tratados com OHB apresentaram maior quantidade e intensidade de células positivas para SOD1, o que reforça os efeitos antioxidativos da terapia hiperbárica.

Figura 42 – Gráficos da análise por SOD1 em diferentes regiões cerebrais

Figura 42: Gráficos da análise por SOD1 no córtex dorsal ao ventrículo lateral (CTX VL), no córtex dorsal ao hipocampo (CTX Hip) e na subárea hipocampal CA1. Nota-se que em todas as regiões, os animais hidrocefálicos que foram tratados com OHB apresentaram tanto a porcentagem de marcação quanto a intensidade, maiores que seus grupos correspondentes sem a terapia associada. Diferenças encontradas na porcentagem de marcação entre COHB e os grupos HNT e HTO no córtex dorsal ao hipocampo ($p < 0,05$) e, em CA1, tanto na porcentagem de marcação, quanto na intensidade, entre os grupos HTOD e HNT ($p < 0,05$).

Fonte: acervo pessoal.

Figura 43 – Análise por SOD1 em diferentes regiões cerebrais

Figura 43: Fotomicrografias referentes a análise por SOD1 no córtex dorsal ao ventrículo lateral (CTX VL), córtex dorsal ao hipocampo (CTX Hip) e na subárea hipocampal CA1. As setas apontam células positivas para SOD1. Nota-se menor número de células marcadas e menor intensidade no grupo HNT. Já dentre os grupos hidrocefálicos tratados, destacam-se os grupos HTO e HTOD com maior número de células positivas e alta expressão de SOD1, semelhantes aos grupos controles. Objetiva de 4x. Barra: 100 μ m.

Fonte: acervo pessoal.

6.9. Análise bioquímica por ELISA

Na análise por ELISA para a proteína GFAP no córtex cerebral não observamos diferenças. Os grupos HNT e HTD apresentaram maiores médias de expressão de GFAP (1,6 ng/mg $\pm$ 0,6 e 1,7 ng/mg $\pm$ 0,4, respectivamente), enquanto os demais grupos expressaram médias ligeiramente menores: C 1,3 ng/mg ($\pm$ 0,5), COHB 1,3 ng/mg ($\pm$ 0,2), HTO 1,2 ng/mg ($\pm$ 0,5) e HTOD 1,5 ng/mg ($\pm$ 0,6). Já no hipocampo, diferenças foram observadas entre os grupos HTD, com a maior expressão da proteína e HTO, com a menor ($p = 0,02$). Os valores encontrados foram: C 1,5 ng/mg ($\pm$ 0,6), COHB 1,5 ng/mg ($\pm$ 0,4), HNT 1,8 ng/mg ($\pm$ 0,9), HTO 1,3 ng/mg ($\pm$ 0,5), HTD 2,6 ng/mg ($\pm$ 1,2) e HTOD 1,6 ng/mg ($\pm$ 0,7). Já na análise para a proteína MBP não foram observadas diferenças em nenhuma das regiões avaliadas. Os valores encontrados na região cortical foram: C 0,4 ng/mg ($\pm$ 0,4), COHB 0,5 ng/mg ($\pm$ 0,4), HNT 0,2 ng/mg ($\pm$ 0,3), HTO 0,3 ng/mg ($\pm$ 0,1), HTD 0,3 ng/mg ($\pm$ 0,2) e HTOD 0,4 ng/mg ($\pm$ 0,3), com maior expressão nos grupos C, COHB e HTOD. E no hipocampo, os valores encontrados foram: C 1 ng/mg ($\pm$ 0,7), COHB 1 ng/mg ($\pm$ 0,9), HNT 0,6 ng/mg ($\pm$ 0,2) (com menor expressão da proteína), HTO 0,9 ng/mg ($\pm$ 0,3), HTD 0,7 ng/mg ($\pm$ 0,6) e HTOD 0,9 ng/mg ($\pm$ 0,5). Os gráficos referentes a estas análises podem ser observados na figura 44.

Figura 44 – Análise bioquímica por ELISA para GFAP e MBP

Figura 44: Gráficos da análise bioquímica por ELISA para GFAP (1ª fileira) e MBP (2ª fileira) no córtex cerebral (CTX) e hipocampo (H). A proteína GFAP encontra-se aumentada nos grupos HNT e HTD em ambas as regiões quando comparada com os grupos correspondentes. Diferença significativa entre os grupos HTD e HTO no hipocampo. Já para MBP não observamos diferenças.

Fonte: acervo pessoal.

7. DISCUSSÃO

A hidrocefalia é um complexo fisiopatológico que envolve diversos mecanismos e permanece sendo um importante objeto de pesquisa, especialmente para a neurocirurgia pediátrica (OI, 2011), visto que o comprometimento da ventriculomegalia é mais impactante durante o período de desenvolvimento. Apesar dos avanços tecnológicos nos sistemas de derivação liquórica, a busca por terapias farmacológicas e/ou procedimentos destinados a atenuar as lesões secundárias da hidrocefalia cresce progressivamente. É necessário entender a patogênese da hidrocefalia e, então, buscar novos métodos de tratamento que possam reduzir os impactos de sua progressão. Embora os modelos experimentais não reproduzam totalmente a condição humana, novos estudos podem fornecer embasamento científico para compreensão e manejo da hidrocefalia e de seus consequentes danos neurológicos (DI CURZIO, 2018).

Em uma busca pelo Pubmed com os termos “*hydrocephalus*” e “*hyperbaric oxygen therapy*” foram encontrados apenas 12 resultados que incluíam estudos clínicos e experimentais. Destes, dez artigos abordavam outras doenças neurológicas e tinham a hidrocefalia apenas como consequência. Foram relatados resultados que apoiam o uso da OHB em lesões do SNC, como: no bom prognóstico funcional após a combinação da reabilitação com a OHB em pacientes com hemorragia subaracnoidea aneurismática (WANG *et al.*, 2020), na melhora significativa do prognóstico de pacientes com lesão cranioencefálica grave (XU *et al.*, 2016), melhora das funções neurocomportamentais, aprendizagem e memória de ratos com hemorragia subaracnoidea (HU *et al.*, 2014) e melhora do retardo mental e paralisia cerebral em ratos com hemorragia na matriz germinativa (LEKIC *et al.*, 2011). Um artigo aborda o uso da OHB em pacientes idosos com hidrocefalia de pressão normal. Os autores relatam que, após seis meses, o grupo que recebeu as sessões terapêuticas de OHB obteve melhoras cognitivas mais significativas que o grupo sem a terapia (YANG *et al.*, 2017). E apenas um artigo aborda a hidrocefalia como condição neurológica principal. Trata-se do estudo prévio de nosso grupo de pesquisa em que observamos que a terapia hiperbárica foi benéfica em ratos hidrocefálicos ao reduzir a astrogliose reativa e melhorar a performance dos animais em testes comportamentais (DA SILVA *et al.*, 2018). Para dar continuidade nesta linha de pesquisa, no atual estudo, buscamos entender quais os principais mecanismos de ação da oxigenoterapia hiperbárica na hidrocefalia experimental e se sua associação com a derivação liquórica, o tratamento padrão da hidrocefalia, pode trazer algum benefício adicional. Imaginamos que o aumento da difusão do conteúdo de O₂ no sangue, com consequente aumento da pressão tecidual de O₂, melhora o suprimento sanguíneo das células cerebrais danificadas e

impede/regride toda a cascata de eventos deletérios decorrentes após o processo inflamatório e o estado hipóxico gerado na hidrocefalia experimental. Com isso, é possível reparar danos subcelulares (organelas celulares ou alteração da função celular) e promover a neuroproteção.

Na avaliação do ganho ponderal, observamos que os grupos controles foram os que ganharam o maior percentual de peso, seguidos dos grupos derivados. Já os grupos hidrocefálicos não operados obtiveram menor ganho de peso durante o experimento, com destaque para o grupo HNT. Com a progressão da ventriculomegalia, o perímetro cefálico é aumentado e o afastamento das suturas que formam a fontanela anterior tornam seu fechamento tardio, o que permite maior crescimento ventricular com o passar dos dias. Conforme esse crescimento avança, mais dificuldades vão sendo observadas, como a locomoção mais lenta e maiores dificuldades durante a amamentação. Costa (2010) relata que a criança hidrocefálica pode apresentar dificuldade na alimentação devido ao mau alinhamento da cabeça e também paresia ou paralisia de alguns músculos da face devido ao comprometimento dos nervos cranianos. É possível que o mesmo ocorra nos animais hidrocefálicos, o que dificultaria o ganho de peso. Com nossos resultados podemos entender que a derivação liquórica, através da descompressão tecidual e diminuição da ventriculomegalia (como observado na UST), tenha ajudado os animais operados a terem menos dificuldades na amamentação, facilitando o ganho de peso semelhante aos grupos controles, assim como também observado por Del Bigio et. al (1997). Os autores associaram o shunt realizado uma semana após a indução de hidrocefalia a um padrão normal de ganho de peso. E é possível que a OHB tenha potencializado esse efeito.

No teste de campo aberto, não observamos diferenças, mas em todas as variáveis analisadas o grupo HNT tende a ter os piores resultados. Na exploração vertical, os animais do grupo HNT apresentaram dificuldades em se manterem de pé apenas nas patas traseiras, sem apoiarem as patas dianteiras no acrílico da arena. Tais dificuldades podem ser atribuídas a inúmeros fatores, como a destruição da substância branca periventricular pela ventriculomegalia, que resulta em disfunções cognitivas e motoras associadas a dano axonal ou a desconexão de neurônios do córtex motor primário, como visto por Del Bigio et al. (2003) em ratos e humanos com hidrocefalia crônica. A dificuldade também pode estar relacionada ao prejuízo de estruturas relacionadas com o equilíbrio, o que também prejudica o aspecto motor, como a compressão de núcleos da base, do tálamo e de feixes de substância branca de acordo com o grau da ventriculomegalia, o que pode prejudicar o ajuste motor. Em casos de hidrocefalia grave, até mesmo o cerebelo pode ser afetado. O grupo HNT também apresentou menor tempo em *grooming*, o que está associado negligência com a higiene, o que afeta sua interação com os demais membros da ninhada e aumenta os níveis de estresse, assim como

observado por Smolinsky et al. (2009) e menor escore da atividade locomotora, pelos mesmos motivos supracitados que podem afetar o desempenho motor. Os grupos operados atingiram notas semelhantes aos controles e isto pode ter ocorrido devido a derivação proporcionar uma redução do tamanho ventricular e descompressão do manto cortical, o que pode amenizar as lesões periventriculares, inclusive nas áreas motoras, como observado por Catalão et al. (2014). Como o grupo HTO obteve notas superiores ao grupo HNT, é possível atribuir tal resultado a maior oferta de O₂ aos tecidos, o que pode ter melhorado a locomoção, assim como já observado por outros autores (HUANG; OBENAU, 2011; YIN; ZHANG, 2005). Esses benefícios também se refletiram no grupo HTOD, ou seja, é possível que a descompressão associada a maior oferta de O₂ aos tecidos é um potente mecanismo de ação para a melhora do comportamento motor. Um fator que pode ter interferido em nossos resultados foi o tempo limite de avaliação em cada sessão de teste. Nos protocolos encontrados na literatura, a avaliação varia de dois a 20 minutos, sendo mais frequentemente utilizado o de cinco, assim como listado nas revisões feitas por Walsh e Cummins (1976) e por Prut e Belzung (2003). Em nossas análises contabilizamos apenas dois minutos, talvez em uma maior faixa de tempo, estes resultados tivessem sido mais expressivos.

O teste do labirinto aquático vem sendo utilizado na pesquisa neurocomportamental há mais de 50 anos para investigar a aprendizagem espacial e a memória. A ventriculomegalia pode gerar comprometimento na memória, na aprendizagem espacial, na atenção, no processamento de informações e na formação cognitiva por destruir circuitos neurais funcionalmente integrados que dependem de ações coordenadas de diversas regiões do cérebro, tais como o córtex somatossensorial e o hipocampo (CHEN *et al.*, 2017) e também por comprimir vasos sanguíneos, prejudicando o aporte de O₂ aos tecidos (DEL BIGLIO *et al.*, 1997). Em nosso estudo, conforme os dias de treinamento, todos os grupos conseguiram diminuir o tempo de latência até o encontro da plataforma. O grupo HTO se destacou em todos os testes, sendo o segundo grupo mais ágil na última avaliação com a plataforma. No momento em que a plataforma foi retirada e os animais foram sujeitos ao teste de exploração e precisão espacial, o grupo HTOD foi o que permaneceu mais tempo circulando pelo quadrante alvo. Julgamos que a OHB possa oferecer benefícios à memória e à aprendizagem espacial destes animais, visto que, o grupo tratado apenas com derivação liquórica não se diferenciou dos demais. No trabalho de Chen et al. (2020), o teste mostrou que a OHB atenuou o declínio na aprendizagem e na memória em um modelo de isquemia-reperfusão em ratos. Os animais não tratados mostraram maior latência para encontrar a plataforma oculta e o número de cruzamentos e de permanência no quadrante alvo, também foi menor. Os autores descobriram que a OHB inibiu a autofagia

celular, atenuou a sobrecarga de cálcio e suprimiu a inflamação, oferecendo efeito neuroprotetor para a memória e aprendizagem espacial. Quanto aos animais HTD, podemos pensar que a cânula possa ter atrapalhado o nado dos animais, por ser uma atividade mais vigorosa. Ainda assim, podemos considerar o resultado do teste de precisão espacial (sem a plataforma) como positivo, pois estes animais se assimilaram aos controles. Santos et al. (2019) relataram resultados semelhantes e concluíram que os animais derivados foram capazes de memorizar o caminho para a plataforma, indicando o restabelecimento da memória espacial após a manobra.

A tarefa de reconhecimento de objeto surgiu como um método para testar a neurobiologia da memória não espacial em roedores. Esta tarefa observa a tendência natural dos roedores de explorar novos itens e, dependendo da quantidade de tempo em que passam explorando os objetos apresentados, inferências sobre a memória podem ser estabelecidas. Os roedores exibem uma tendência natural para explorar objetos novos e, durante a sessão de teste, é possível observar menor interesse pelo objeto familiar. A preferência pelo novo objeto indica que a memória do objeto familiar foi devidamente codificada, consolidada e, em seguida, recuperada para guiar o comportamento do roedor durante o teste (COHEN; STACKMAN, 2015). Nosso trabalho aponta que o grupo HTO apresentou índice de reconhecimento do novo objeto semelhante ao grupo C e maior que o grupo HNT. Assim como na avaliação motora do *water maze*, os grupos derivados podem ter apresentado um pouco mais de dificuldade em brincar com o novo objeto por algum incômodo que a cânula tenha causado, mas suas memórias possuem certo nível de preservação visto que seus resultados foram superiores aos dos animais HNT. Na literatura, apenas um artigo relaciona o teste de reconhecimento de objeto com a OHB, porém, era um estudo em que avaliava os efeitos tóxicos do O₂ em altas pressões (6 ATA, praticamente o dobro do que foi usado no presente estudo, o que não se enquadra com nossos parâmetros) (DOMACHEVSKY *et al.*, 2013). A avaliação do teste com a cirurgia de derivação liquórica também não foi abordada na literatura científica. O que já é sabido é que a formação hipocampal participa da codificação e consolidação da memória de reconhecimento de objeto, como já observado por outros autores (ANTUNES; BIALA, 2012; BROADBENT *et al.*, 2010; COHEN; STACKMAN, 2015) e que em situações de dano o desempenho no teste é prejudicado, o que pode explicar os piores resultados do grupo HNT. Em contrapartida, vários estudos apontam efeitos positivos da OHB na formação hipocampal, como o aumento dos níveis de BDNF, que preserva a neurogênese e impede os déficits de aprendizagem e memória (LIU *et al.*, 2016), prevenção da apoptose neuronal e aumento da atividade enzimática antioxidante (LI *et al.*, 2008; PENG *et al.*, 2010; WADA *et al.*, 1996). Em um estudo clínico que trataram pacientes pós-AVE com OHB, benefícios cognitivos também foram encontrados em 86% dos

participantes. A OHB induziu um aumento significativo em todos os domínios da função cognitiva e melhora da velocidade de processamento de informações. Os autores acreditam que a OHB ajuda na melhora do metabolismo energético, diminui a resposta inflamatória pós-isquêmica reduzindo os danos da barreira hematoencefálica e induz a neuroplasticidade (HADANNY *et al.*, 2020). o que pode ter conferido melhor desempenho para os animais tratados com OHB e, de fato, nossos resultados apontam para esta mesma direção.

Através dos exames de imagem por UST foi possível acompanhar a progressão da hidrocefalia. Os animais que não receberam nenhum tipo de tratamento apresentaram aumento de 15,3% da razão ventricular entre as duas avaliações. Já o grupo HTO também apresentou aumento, mas de apenas 3,9%. Este menor índice da expansão ventricular do grupo HTO pode estar relacionado a ação anti-inflamatória da OHB inclusive no local onde o caulim foi injetado. Com 7 dias de vida, os animais são submetidos à injeção de caulim na cisterna magna, o que provoca um processo inflamatório na saída do quarto ventrículo e impede a passagem do líquido para o espaço subaracnoideo. Como a OHB já começa a ser aplicada um dia após a indução, este processo inflamatório agudo formado pode estar sendo resolvido, permitindo a passagem de uma pequena porcentagem de LCR por alguns pontos do exsudato inflamatório. Dentre os grupos derivados, observamos que a DVS foi eficaz e reduziu em 12,8% a razão ventricular no grupo HTD e em 28,8% no grupo HTOD. Seria interessante realizar o tratamento tardio para avaliar se a OHB continuaria “limitando” esse aumento da ventriculomegalia.

Na avaliação por HE, o maior comprometimento, quando considerado o córtex dorsal ao ventrículo lateral e o corpo caloso, foi observado no grupo HNT, assim como relatado por outros autores em estudos que avaliaram os danos teciduais pós-ventriculomegalia (DEL BIGIO, 2010; DEL BIGIO; KHAN *et al.*, 2012; JUGÉ *et al.*, 2016). As terapias utilizadas promoveram preservação celular com aspecto histológico semelhante ao controle e a terapia hiperbárica não mostrou ser superior à derivação nesse aspecto. Já o hipocampo, mostrou-se deslocado dorsalmente e comprimido no seus diâmetros látero-lateral e ântero-posterior pela dilatação do corno temporal do ventrículo lateral, principalmente no grupo HNT, e o grau de alteração era diretamente proporcional ao grau de dilatação ventricular. Outros autores descreveram danos semelhantes no hipocampo (KNIERIM, 2015; TAVEIRA *et al.*, 2012; TURGUT; BAKA; UYANIKGIL, 2018) e Kriebel e McAllister (2000) ainda observaram que as lesões hipocámpais são capazes de gerar grandes dificuldades na criação de novas memórias afetando diretamente o desempenho cognitivo. Nós também observamos alteração nos testes comportamentais de memória, portanto, essas observações de danos hipocámpais indicam ser o substrato principal para as alterações comportamentais que relatamos. Isto é reforçado pelo

fato do grupo HNT ter apresentado o maior nível de comprometimento hipocampal com a verificação da presença de rasgos, deslocamentos e compressão, enquanto os grupos que receberam tratamento cirúrgico e/ou com a OHB mostraram menores índices de danos às estruturas hipocampais e melhores resultados nos testes de memória.

Boa parte do amadurecimento pós-natal implica em mielinização das estruturas do SNC. Podemos verificar que a expansão ventricular promoveu diminuição da tonalidade azul na hidrocefalia, indicando redução na mielinização da substância branca. Isto foi particularmente observado no CC, mas também em outras áreas da substância branca subcortical. Este fato já havia sido relatado por outros autores usando histoquímica por LFB (AYANNUGA; SHOKUNBI; NAICKER, 2016; JUGÉ *et al.*, 2016) mas também através de outros métodos similares, como o solocromo-cianina (CARDOSO *et al.*, 2011; LOPES; SLOBODIAN; DEL BIGIO, 2009). Notadamente, o grupo HNT foi aquele com a tonalidade azul mais esmaecida, enquanto os tratamentos demonstraram alguma recuperação na mielinização. Ainda que a derivação liquórica tenha resultado em ligeira recuperação da espessura do CC, esta não foi completa, pois se manteve ainda pouco mais fina que a comissura dos ratos controles. Isso pode, em parte, ser explicado pelo fato de a derivação não ter reduzido o volume ventricular a valores normais como bem observado na comparação da UST pré-cirúrgica com a do final do experimento. Mesmo com essa recuperação incompleta, Del Bigio *et al.* (1997) mostra que o *shunt* consegue preservar a estrutura básica do CC e compensar desenvolvimento do conteúdo de mielina. O CC funcionalmente participa da transferência de informações entre os hemisférios cerebrais tendo, portanto, um papel importante no desempenho comportamental. Assim, essas observações de lesões causadas pela hidrocefalia no CC e verificadas pela presença de redução de espessura, presença de rasgos e edema, além da sugestão de atraso na mielinização, devem ter contribuído também para o prejuízo do desempenho dos animais nos testes comportamentais. Em contrapartida, a performance pouco melhor dos animais tratados pode ser, ao menos em parte, fruto da recuperação do CC.

Com esses resultados de redução da tonalidade azul no LFB na hidrocefalia, era de se esperar que a quantidade de mielina mostrasse estar diminuída. Entretanto, na quantificação da MBP por ELISA na região dorsal ao ventrículo lateral e no hipocampo, não constatamos diferenças entre os grupos, ainda que os animais do grupo HNT apresentassem uma tendência de concentrações menores desta proteína. É possível que não tenhamos observado diferenças pois, quando consideramos o manto cortical dorsal ao ventrículo lateral, as amostras coletadas incluíam, além do CC e da substância branca subcortical, todo o neocórtex dorsal desta região. Julgamos que no caso de amostras restritas à substância branca, as dosagens de mielina fossem

mais fidedignas. A redução da mielina na hidrocefalia pode estar relacionada tanto a lesão direta das fibras nervosas, quanto pelo comprometimento dos oligodendrócitos e consequente prejuízo na remielinização (OLOPADE; SHOKUNBI; SIRÉN, 2012). Del Bigio et. al. (1998) observaram perda de oligodendrócitos em ratos com hidrocefalia experimental e atribuíram o fato à morte celular, à isquemia crônica, toxicidade do glutamato acumulado e inflamação da substância branca. Por outro lado, estudos demonstraram que a terapia hiperbárica tem a capacidade de reverter ou prevenir estes eventos observados nas lesões causadas pela hidrocefalia (CHEN *et al.*, 2020; MATCHETT; MARTIN; ZHANG, 2009). Apesar de não termos realizado um estudo específico da função dos oligodendrócitos, julgamos que estas células podem sim estar envolvidas na redução da mielina, como também que a terapia hiperbárica pode ter interferido positivamente na recuperação funcional dessas células.

A análise de biomarcadores é uma ferramenta essencial no estudo da hidrocefalia por poder associar alterações celulares, bioquímicas e moleculares às forças mecânicas e mudanças metabólicas pós-dilatação ventricular (SURYANINGTYAS *et al.*, 2020). A astrogliose é uma reação de resposta natural quando há presença de lesões de várias naturezas que afetam o SNC. Porém, o aumento da taxa de proliferação e hipertrofia dos astrócitos podem atrapalhar a recuperação estrutural e funcional do sistema nervoso (DEL BIGIO, 2010), com prejuízo no fluxo de informações, pois os astrócitos tem importante papel regulatório nas sinapses (LEE *et al.*, 2015). Somado a isso, sabe-se que a cicatriz glial produz diversas moléculas envolvidas na neuroinflamação que, consequentemente, inibem a regeneração axonal, impedem a remielinização e favorecem a desmielinização (FAWCETT; ASHER, 1999; SILVER, 2016; SOFRONIEW, 2009). Observamos proliferação e hipertrofia dos astrócitos nos animais HNT, mas a astrogliose foi ainda mais intensa nos grupos derivados, em especial, no grupo HTD. Ainda que a astrogliose possa estar relacionada com a travessia do tecido nervoso pelo cateter de derivação nos animais operados como sugerido por outro trabalho de nosso grupo de pesquisa (SANTOS et al., 2019), não podemos descartar a hipótese de este processo neuroinflamatório estar relacionado com o processo de reparação tecidual em si, como também sugerido por Eskandari et al. (2011) em um estudo com gatos hidrocefálicos tratados com *shunt*. Portanto, a hidrocefalia isolada causou astrogliose reativa às inúmeras lesões teciduais secundárias à ventriculomegalia e o procedimento cirúrgico potencializou o processo neuroinflamatório. Por outro lado, a OHB reduziu a neuroinflamação em animais hidrocefálicos não derivados, o que reforça a premissa de que a derivação promove o incremento da reparação por astrogliose. A OHB foi associada à redução significativa dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como a IL6, o TNF- α , ICAM-1 e a IL1- β em um estudo sobre hemorragia

subaracnoidea em ratos e a redução da neuroinflamação foi associada a melhora neurológica e ao alívio da lesão cerebral (LIU *et al.*, 2016). Em outro estudo, os autores também viram que a OHB diminuiu a astrogliose reativa, reduziu a cicatriz glial, evitou a ativação da cascata deletéria de eventos CD40, CD40L e ICAM-1 e evitou a degeneração neural. Os autores concluíram que a OHB, ao limitar a produção de mediadores inflamatórios, promoveu a formação de um ambiente mais permissivo para reparo e regeneração (LAVRNJA *et al.*, 2015), o que provavelmente tenha ocorrido em nosso estudo.

A ciclooxygenase é uma enzima que limita a velocidade do metabolismo do ácido araquidônico em prostanoídes (prostaglandinas e tromboxanos). Já é conhecido que a COX-1 é expressa constitutivamente em condições fisiológicas e a COX-2, que normalmente é expressa nos neurônios do cérebro, é induzível em resposta a mitógenos, endotoxinas e citocinas. Esta é rapidamente induzida em tecidos inflamados, e seus produtos de reação são responsáveis por muitos dos efeitos citotóxicos da inflamação (SEIBERT *et al.*, 1995). Em uma grande variedade de doenças que afetam o cérebro, a indução de COX-2 está associada à desarranjos patofisiológicos complexos, como a isquemia e a inflamação (IADECOLA *et al.*, 1999; LACROIX; RIVEST, 1998), duas vias intimamente ligadas à hidrocefalia. Observamos, em todas as regiões cerebrais avaliadas, notável aumento da COX-2 nos animais do grupo HNT. Também constatamos que os tratamentos instituídos foram capazes de reduzir a imunomarcagem por COX-2, principalmente no grupo HTOD. Tal redução foi especialmente significativa nas áreas hipocâmpais CA1 e CA3, regiões conhecidamente relacionadas com a memória. Santos *et al.* (2019), mostraram que a hidrocefalia eleva os níveis líquidos do TNF- α e da IL-1 β , além de aumento moderado da IL-6. Estas citocinas inflamatórias destacam-se como fatores estimuladores do gen para a produção de COX-2, como evidenciado por Bakhle e Botting (1996). Em um estudo de isquemia cerebral focal transitória em ratos, Yin, *et al.* (2002) observaram que o tratamento com OHB foi capaz de inibir a superexpressão de COX-2 no córtex cerebral a nível de mRNA e de proteína. Utilizando esse mesmo modelo, Cheng *et al.* (2011) relataram que o tratamento precoce com OHB aumentou o número de neurônios sobreviventes em CA1, o que foi associado à redução da expressão de COX-2 no hipocampo e no córtex cerebral após o evento isquêmico. Menor expressão de COX-2 pode resultar em lesão cerebral diminuída por taxas inferiores de inflamação, morte celular oxidativa e apoptose (JADHAV *et al.*, 2009). A região promotora do DNA da COX-2 contém vários de fatores de transcrição, como a NF κ B, a NF-IL6 e a CREB. É, portanto, concebível que os radicais livres e as citocinas produzidas após o evento isquêmico cerebral possam regular positivamente o mRNA da COX-2 e, como a OHB reduz o óxido nítrico e as citocinas pró-inflamatórias, esta

também pode reduzir diretamente a expressão de COX-2, regulando negativamente esses fatores de transcrição relacionados à inflamação (LACROIX; RIVEST, 1998).

Diferentemente dos bebês humanos a termo, pequenos roedores ainda apresentam encéfalos com considerável volume de MG funcional e, conseqüentemente, número abundante de células em replicação localizadas ao redor ventrículos cerebrais. Portanto, a hidrocefalia fetal, como também a hidrocefalia induzida em ratos muito jovens, ocorre em um momento em que os neurônios estão se proliferando e migrando para sua posição final ou formando sinapses com outros neurônios na produção dos circuitos cerebrais (FEMI-AKINLOSOTU; SHOKUNBI, 2020). Danos a esta região causam perda de células-tronco neurais e da camada endimária, levando a neurogênese anormal (HENZI *et al.*, 2020). Através da imunomarcagem por Ki-67, observamos significativa redução da população celular total e de células em replicação no grupo HNT. Em contrapartida, nos animais que foram tratados, notamos maior preservação da população celular e mais células em replicação, especialmente quando os tratamentos instituídos foram aplicados em conjunto. Santos *et al.* (2019) também observaram redução de células mitóticas na MG em ratos hidrocefálicos e, embora o tratamento com a derivação tenha mostrado ligeira maior imunomarcagem por Ki-67, os autores concluem que a DVS isolada não impediu totalmente a ocorrência de danos. A OHB já se mostrou benéfica na preservação de células em replicação tanto na MG, como observado por nosso grupo de pesquisa na hidrocefalia (DA SILVA *et al.*, 2018), quanto em outras condições, como no modelo de isquemia/reperfusão (MIGITA *et al.*, 2016) e no envenenamento por monóxido de carbono (LIU *et al.*, 2016). Estes últimos autores citados observaram aumento do Ki-67 no giro denteado após o tratamento com a OHB e isto foi associado a redução dos prejuízos na memória.

Encontra-se bem estabelecido que, entre os prejuízos secundários causados pela hidrocefalia, a morte celular está presente. Em nossas análises por imunomarcagem para caspase-3, observamos que o grupo HNT apresentou considerável número de células em apoptose, enquanto que todos os grupos tratados mostraram imunomarcagem menor que o grupo hidrocefálico sem tratamento. Dentre esses grupos tratados, o grupo HTOD apresentou menor índice de células em apoptose, mostrando que a derivação líquórica isolada não foi suficiente para a total proteção contra a morte celular, enquanto que a associação dos dois tratamentos potencializou este efeito benéfico. Outros trabalhos de nosso grupo de pesquisa já haviam relatado que a derivação isolada não foi suficiente para resolver a cascata da apoptose (SAMPAIO *et al.*, 2019; ROMEIRO, 2021). Em contrapartida, os efeitos anti-apoptóticos da OHB já estão bem estabelecidos (MATCHETT; MARTIN; ZHANG, 2009), como a regulação positiva da expressão de SirT1, que aumentou a Bcl-2 (fator anti-apoptótico) e reduziu a

caspase-3, em um modelo de isquemia cerebral focal (DING *et al.*, 2017); aboliu a fragmentação de DNA, uma característica da apoptose, e reduziu o número de células TUNEL-positivas, também na isquemia cerebral focal (YIN; ZHOU *et al.*, 2003); aumentou o BDNF, regulou a sobrecarga de cálcio e autofagia celular (mediada pela via mTOR e envolvida na morte neuronal), diminuiu a caspase-3 e regulou o Bcl-2 em modelos de isquemia-reperfusão (CHEN *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2017). Observou-se também que, em um modelo de ratos com traumatismo cranioencefálico, a OHB aumentou a IL-10 e diminuiu a caspase-3 (FISCHER; BARAK, 2020). Os autores concluíram que além de interromper danos futuros, a OHB já inicia o processo de cicatrização tecidual. Em um modelo de Alzheimer, Zhao *et al.*, (2017) constataram diminuição da apoptose no hipocampo, principalmente em CA1, e atribuíram tal resultado à diminuição da taxa de p38 MAPK e de TNF- α , mediadores pró-apoptóticos. Neste nosso estudo observamos que a associação da OHB com a derivação líquórica foi capaz tanto de melhorar a replicação celular quanto reduzir a apoptose, o que pode, ao menos em parte, explicar os bons resultados nos testes comportamentais.

A proteína nuclear neuronal (NeuN) além de estar localizada nos núcleos, também está presente no citoplasma perinuclear da maioria dos neurônios do SNC dos mamíferos, e é frequentemente usada como um marcador de neurônios pós-mitóticos (GUSEL'NIKOVA; KORZHEVSKIY, 2015). Esta proteína atua na sinaptogênese, na modulação da secreção de neurotransmissores (KIM; ADELSTEIN; KAWAMOTO, 2009), mas também contribui para a regulação da diferenciação de neurônios no sistema nervoso (KIM *et al.*, 2013) e vem sendo amplamente utilizada na avaliação do estado neuronal, tanto na normalidade quanto na patologia (COLLOMBET *et al.*, 2006; GUSEL'NIKOVA; KORZHEVSKIY, 2015). Em nossas análises, o grupo HNT apresentou a menor quantidade de células totais, de células imunomarcadas e o menor escore de intensidade quando comparado aos demais grupos, claras evidências de lesão neuronal, assim como observado por outros autores (UNAL-CEVIK *et al.*, 2004; TIPPET *et al.*, 2007; DAVOLI *et al.*, 2002). E os tratamentos utilizados não foram suficientes para mudar de maneira significativa este panorama. As lesões da hidrocefalia somente envolvem gravemente os neurônios após o período de cronicidade da doença, como também em casos de ventriculomegalia grave, portanto, idealmente deveríamos ter analisado esse aspecto da lesão separando-se os animais hidrocefálicos quanto ao grau de ventriculomegalia, assim como feito por Olopade *et al.*, (2012), porém, o número de animais por grau de ventriculomegalia em nosso estudo foi insuficiente. Adicionalmente, um trabalho prévio de nosso grupo de pesquisa demonstrou, através da imunofluorescência de dupla marcação, que os neurônios corticais de animais hidrocefálicos apresentavam maior marcação

de caspase-3 (GARCIA *et al.*, 2017). Julgamos que, os motivos que levaram à menor reatividade de NeuN nos animais sem tratamento foi a morte celular, a degeneração axonal decorrente do maior índice de picnose, maior astrogliose reativa, maior neuroinflamação e menor taxa de proliferação celular dado o dano na região da matriz germinativa. A derivação líquórica isolada ajudou pouco a preservar os neurônios e podemos presumir que a descompressão cortical pode ter ajudado a evitar maiores danos neuronais.

A enzima SOD1 é expressa na maioria dos tecidos e é responsável por regular os níveis de EROs normalmente produzidas nas células e que são tóxicas para os sistemas biológicos, desempenhando assim um papel importante na homeostase do tecido. Em animais com deficiência de SOD1, lesões induzidas por radicais livres levam a doenças degenerativas ou inflamatórias (ARIMA *et al.*, 2020). O estresse oxidativo se manifesta como a oxidação de proteínas, danos ao DNA com aumento das taxas de mutação e peroxidação lipídica, resultando em danos à membrana, perturbação metabólica e morte celular (PISOSCHI; POP, 2015). Tal condição está presente na hidrocefalia devido à compressão e estiramento do parênquima cerebral, que gera uma lesão tecidual através da peroxidação lipídica e possui efeito tóxico nas paredes dos vasos arteriais cerebrais (TURGUT *et al.*, 2018). Por ser um órgão rico em ácidos poli-insaturados, o cérebro é um dos locais mais afetados pelo estresse oxidativo, há nele maior quantia de oxigênio sendo consumida, gerando, conseqüentemente, elevadas taxas de radicais livres a partir de EROs ou de nitrogênio (ERN) (FINKEL; HOLBROOK, 2000; HALLIWELL, 2000). Em uma única referência encontrada, apenas Mori *et al.* (1993) utilizaram a análise da SOD1 na hidrocefalia experimental. Os autores observaram a presença reduzida de SOD1 no plexo coroide, no hipocampo e no epêndima dos ratos hidrocefálicos quando comparados aos controles e mencionaram que a diminuição de SOD pode alterar o mecanismo de produção de LCR pelo plexo coroide através do distúrbio funcional do movimento ciliar sobre a parede ventricular e, conseqüentemente, agravar as manifestações clínicas da hidrocefalia. Em nossos animais HNT, também encontramos maior razão ventricular quando comparado aos outros animais hidrocefálicos e essa alteração ciliar endimária poderia estar implicada no mecanismo de agravamento da ventriculomegalia, enquanto a OHB, como redutora do processo inflamatório, poderia por si atuar como limitadora desse aumento ventricular. Várias linhas de investigação mostram que a OHB induz um estresse oxidativo inicial devido à maior oferta de O₂, entretanto, este aumento atua como um mecanismo desencadeador de respostas antioxidantes endógenas (GAO; RAO; LI, 2017) desempenhando um papel importante na formação da tolerância à lesão isquêmica (LISKA *et al.*, 2018). As defesas contra o estresse oxidativo incluem a SOD, a glutatona peroxidase, a catalase, entre outras e a OHB está

associada à manutenção dessas defesas intracelulares (NITA *et al.*, 2001; WARNER; SHENG; BATINIĆ-HABERLE, 2004). Estudos que avaliaram a SOD1 após o tratamento com OHB observaram aumento de sua expressão na isquemia cerebral (MRSIĆ-PELCIĆ *et al.*, 2004) e na hipóxia-isquemia (FREIBERGER *et al.*, 2006). Foi observado também que a OHB, após acidente vascular encefálico, demonstrou reduzir os níveis de enzimas pró-oxidativas, como o malondialdeído (MDA) (LI *et al.*, 2008), alterações essas que ajudam na proteção após danos por radicais livres (MATCHETT; MARTIN; ZHANG, 2009). Uma das explicações do por que a OHB possui ação antioxidativa é a regulação de FoxO e de Nrf2, que promovem a expressão da SOD e da catalase (LISKA *et al.*, 2018; VNUKOV *et al.*, 2017). Portanto, a maior expressão SOD1 nos grupos HTO e HTOD deste nosso estudo pode garantir maior neuroproteção contra o estresse oxidativo, em especial, na região hipocampal CA1, o que certamente refletiu nos testes comportamentais. Choi e Rothman (1990) observaram que em tecidos hipóxico-isquêmicos há uma grande estimulação glutamatérgica, o que leva à morte neuronal através da ativação do receptor NMDA. Em contrapartida, a SOD1 está relacionada ao controle da liberação do glutamato impedindo a cascata da morte neuronal e sua expressão é incrementada pela ação da OHB (PALZUR *et al.*, 2008; CHENG *et al.*, 2011). Sendo assim, acreditamos que a ação das terapias associadas, com grande protagonismo da OHB, tenha preservado a saúde neuronal e impedido a ocorrência de maiores danos teciduais.

A oxigenoterapia hiperbárica quando associada à cirurgia de derivação liquórica mostra melhorar a performance comportamental, em especial no quesito aprendizagem e memória, reduzir a astrogliose reativa, ajudar na preservação celular, diminuir o processo de morte celular, reduzir a neuroinflamação, preservar a população e a saúde neuronal e gerar o aumento das defesas antioxidantes, oferecendo neuroproteção às estruturas encefálicas afetadas pela ventriculomegalia.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

A oxigenoterapia hiperbárica exerce efeitos neuroprotetores quando associada à cirurgia de derivação liquórica através de mecanismos específicos, como:

- redução da cicatriz glial e da neuroinflamação, em especial, nas subáreas hipocampais intimamente relacionadas com a aprendizagem e a memória.
- preservação da população celular total e em replicação na matriz germinativa.
- redução da morte celular via Caspase-3 no corpo caloso e no córtex dorsal ao ventrículo lateral.
- redução do estresse oxidativo por aumento da expressão de enzima antioxidante.
- maior preservação do conteúdo de mielina.
- preservação da viabilidade neuronal nas regiões corticais e no hipocampo.

Assim, podemos considerar a oxigenoterapia hiperbárica associada à cirurgia de derivação liquórica uma modalidade terapêutica potencialmente benéfica na hidrocefalia experimental.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N. J.; PIZZO, M. E.; PRESTON, J. E.; JANIGRO, D. *et al.* The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system? **Acta Neuropathol**, 135, n. 3, p. 387-407, 03 2018.
- AGHAJAN, Y.; GROVER, I.; GORSI, H.; TUMBLIN, M. *et al.* Use of hyperbaric oxygen therapy in pediatric neuro-oncology: a single institutional experience. **J Neurooncol**, 141, n. 1, p. 151-158, Jan 2019.
- AISENGART, B.; KAJIWARA, J. K.; VERÍSSIMO MEIRA, K.; DA SILVA LOPES, L. Morphometric analysis of the optic nerve in experimental hydrocephalus-induced rats. **Pediatr Neurosurg**, 47, n. 5, p. 342-348, 2011.
- ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. **Cogn Process**, 13, n. 2, p. 93-110, May 2012.
- ARIMA, T.; IGARASHI, T.; UCHIYAMA, M.; KOBAYASHI, M. *et al.* Hydrogen promotes the activation of Cu, Zn superoxide dismutase in a rat corneal alkali-burn model. **Int J Ophthalmol**, 13, n. 8, p. 1173-1179, 2020.
- AYANNUGA, O. A.; SHOKUNBI, M. T.; NAICKER, T. A. Myelin Sheath Injury in Kaolin-Induced Hydrocephalus: A Light and Electron Microscopy Study. **Pediatr Neurosurg**, 51, n. 2, p. 61-68, 2016.
- BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. **Mediators Inflamm**, 5, n. 5, p. 305-323, 1996.
- BERING, E. A.; SATO, O. HYDROCEPHALUS: CHANGES IN FORMATION AND ABSORPTION OF CEREBROSPINAL FLUID WITHIN THE CEREBRAL VENTRICLES. **J Neurosurg**, 20, p. 1050-1063, Dec 1963.
- BONDURANT, C. P.; JIMENEZ, D. F. Epidemiology of cerebrospinal fluid shunting. **Pediatr Neurosurg**, 23, n. 5, p. 254-258; discussion 259, 1995.
- BOOCKVAR, J. A.; LOUDON, W.; SUTTON, L. N. Development of the Spitz-Holter valve in Philadelphia. **J Neurosurg**, 95, n. 1, p. 145-147, Jul 2001.
- BORENSTEIN-LEVIN, L.; KOREN, I.; KUGELMAN, A.; BADER, D. *et al.* Post-hemorrhagic hydrocephalus and diabetes insipidus in preterm infants. **J Pediatr Endocrinol Metab**, 27, n. 11-12, p. 1261-1263, Nov 2014.
- BOUSSI-GROSS, R.; GOLAN, H.; FISHLEV, G.; BECHOR, Y. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy can improve post concussion syndrome years after mild traumatic brain injury - randomized prospective trial. **PLoS One**, 8, n. 11, p. e79995, 2013.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 1976.

BROADBENT, N. J.; GASKIN, S.; SQUIRE, L. R.; CLARK, R. E. Object recognition memory and the rodent hippocampus. **Learn Mem**, 17, n. 1, p. 5-11, Jan 2010.

BRUGNIAUX, J. V.; COOMBS, G. B.; BARAK, O. F.; DUJIC, Z. *et al.* Highs and lows of hyperoxia: physiological, performance, and clinical aspects. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 315, n. 1, p. R1-R27, 07 01 2018.

BURAS, J. Basic mechanisms of hyperbaric oxygen in the treatment of ischemia-reperfusion injury. **Int Anesthesiol Clin**, 38, n. 1, p. 91-109, 2000.

BURAS, J. A.; REENSTRA, W. R. Endothelial-neutrophil interactions during ischemia and reperfusion injury: basic mechanisms of hyperbaric oxygen. **Neurol Res**, 29, n. 2, p. 127-131, Mar 2007.

CARDOSO, E. J.; LACHAT, J. J.; LOPES, L. S.; SANTOS, A. C. *et al.* Changes caused by hydrocephalus, induced by kaolin, in the corpus callosum of adult dogs. **Acta Cir Bras**, 26 Suppl 2, p. 8-14, 2011.

CASTRO, S. C.; MACHADO, H. R.; CATALÃO, C. H.; SIQUEIRA, B. A. *et al.* 0.1T magnetic resonance image in the study of experimental hydrocephalus in rats. Accuracy of the method in the measurements of the ventricular size. **Acta Cir Bras**, 27, n. 11, p. 768-772, Nov 2012.

CATALÃO, C. H.; CORREA, D. A.; SAITO, S. T.; LOPES, L. A. S. Camellia sinensis neuroprotective role in experimentally induced hydrocephalus in Wistar rats. **Childs Nerv Syst**, 30, n. 4, p. 591-597, Apr 2014.

CATALÃO, C. H. R.; SHIMIZU, G. Y.; TIDA, J. A.; GARCIA, C. A. B. *et al.* Environmental enrichment reduces brain damage in hydrocephalic immature rats. **Childs Nerv Syst**, 33, n. 6, p. 921-931, Jun 2017.

CATALÃO, C. H. R.; SOUZA, A. O.; SANTOS-JÚNIOR, N. N.; DA SILVA, S. C. *et al.* Kaolin-induced hydrocephalus causes acetylcholinesterase activity dysfunction following hypothalamic damage in infant rats. **Brain Res**, 1724, p. 146408, Dec 2019.

CHANG, C. F.; NIU, K. C.; HOFFER, B. J.; WANG, Y. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy for treatment of postischemic stroke in adult rats. **Exp Neurol**, 166, n. 2, p. 298-306, Dec 2000.

CHEN, C.; CHEN, W.; NONG, Z.; NIE, Y. *et al.* Hyperbaric oxygen alleviated cognitive impairments in mice induced by repeated cerebral ischemia-reperfusion injury via inhibition of autophagy. **Life Sci**, 241, p. 117170, Jan 2020.

CHEN, C.; HUANG, L.; NONG, Z.; LI, Y. *et al.* Hyperbaric Oxygen Prevents Cognitive Impairments in Mice Induced by D-Galactose by Improving Cholinergic and Anti-apoptotic Functions. **Neurochem Res**, 42, n. 4, p. 1240-1253, Apr 2017.

CHEN, L. J.; WANG, Y. J.; CHEN, J. R.; TSENG, G. F. Hydrocephalus compacted cortex and hippocampus and altered their output neurons in association with spatial learning and memory deficits in rats. **Brain Pathol**, 27, n. 4, p. 419-436, Jul 2017.

CHEN, X.; DUAN, X. S.; XU, L. J.; ZHAO, J. J. *et al.* Interleukin-10 mediates the neuroprotection of hyperbaric oxygen therapy against traumatic brain injury in mice. **Neuroscience**, 266, p. 235-243, Apr 2014.

CHENG, O.; OSTROWSKI, R. P.; WU, B.; LIU, W. *et al.* Cyclooxygenase-2 mediates hyperbaric oxygen preconditioning in the rat model of transient global cerebral ischemia. **Stroke**, 42, n. 2, p. 484-490, Feb 2011.

CHOI, D. W.; ROTHMAN, S. M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Annu Rev Neurosci**, 13, p. 171-182, 1990.

CHOUX, M.; CAMBOULIVES, J.; RIGAUT, F. [Prevention of infections in ventriculoperitoneal shunts in children]. **Ann Fr Anesth Reanim**, 11, n. 6, p. 699-704, 1992.

CLARK, R. G.; MILHORAT, T. H. Experimental hydrocephalus. 3. Light microscopic findings in acute and subacute obstructive hydrocephalus in the monkey. **J Neurosurg**, 32, n. 4, p. 400-413, Apr 1970.

COHEN, S. J.; STACKMAN, R. W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. **Behav Brain Res**, 285, p. 105-117, May 2015.

COLLOMBET, J. M.; MASQUELIEZ, C.; FOUR, E.; BURCKHART, M. F. *et al.* Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus. **Neurosci Lett**, 398, n. 3, p. 337-342, May 2006.

CORNS, R.; MARTIN, A. Hydrocephalus. **Surgery (Oxford)**, 3, 30, p. 142-148, 2012.

COSTA, A. C. S. M. **Avaliação da Função Motora de Crianças com Hidrocefalia**. Aracajú: Universidade Federal de Sergipe, 2010. 99 f. Dissertação (Mestrado em Medicina).

CUI, H. J.; HE, H. Y.; YANG, A. L.; ZHOU, H. J. *et al.* Hyperbaric oxygen for experimental intracerebral haemorrhage: Systematic review and stratified meta-analysis. **Brain Inj**, 31, n. 4, p. 456-465, 2017.

D'AGOSTINO, D. P.; PUTNAM, R. W.; DEAN, J. B. Superoxide (O_2^-) production in CA1 neurons of rat hippocampal slices exposed to graded levels of oxygen. **J Neurophysiol**, 98, n. 2, p. 1030-1041, Aug 2007.

D'AGOSTINO, M.; FONTES, B.; POGGETTI, R.; BIROLINI, D. Hyperbaric oxygen therapy: types of injury and number of sessions - a review of 1506 cases. **Undersea Hyperb Med**, 1, 35, p. 53-60, 2008.

DA SILVA, S. C.; FERES, O.; DA SILVA BEGGIORA, P.; MACHADO, H. R. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy reduces astrogliosis and helps to recovery brain damage in hydrocephalic young rats. **Childs Nerv Syst**, 34, n. 6, p. 1125-1134, Jun 2018.

DANDY, W. E. EXPERIMENTAL HYDROCEPHALUS. **Ann Surg**, 70, n. 2, p. 129-142, Aug 1919.

DAVIDSON, R. I. Peritoneal bypass in the treatment of hydrocephalus: historical review and abdominal complications. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 39, n. 7, p. 640-646, Jul 1976.

DAVOLI, M. A.; FOURTOUNIS, J.; TAM, J.; XANTHOUDAKIS, S. *et al.* Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. **Neuroscience**, 115, n. 1, p. 125-136, 2002.

DE MOURA SILVA, G. A. P.; DA SILVA, S. C.; DA SILVA BEGGIORA, P.; MATIAS JÚNIOR, I. *et al.* Transcranial ultrasonography as a reliable instrument for the measurement of the cerebral ventricles in rats with experimental hydrocephalus: a pilot study. **Childs Nerv Syst**, 37, n. 6, p. 1863-1869, 06 2021.

DEFEO, D. R.; MYERS, P.; FOLTZ, E. L.; EVERETT, B. *et al.* Histological examination of kaolin-induced hydrocephalus. Its implications in the therapy of animals with experimentally induced hydrocephalus. **J Neurosurg**, 50, n. 1, p. 70-4, Jan 1979.

DEL BIGIO, M. R. Neuropathology and structural changes in hydrocephalus. **Dev Disabil Res Rev**, 16, n. 1, p. 16-22, 2010.

DEL BIGIO, M. R.; CROOK, C. R.; BUIST, R. Magnetic resonance imaging and behavioral analysis of immature rats with kaolin-induced hydrocephalus: pre- and postshunting observations. **Exp Neurol**, 148, n. 1, p. 256-264, Nov 1997.

DEL BIGIO, M. R.; KANFER, J. N.; ZHANG, Y. W. Myelination delay in the cerebral white matter of immature rats with kaolin-induced hydrocephalus is reversible. **J Neuropathol Exp Neurol**, 56, n. 9, p. 1053-1066, Sep 1997.

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

DEL BIGIO, M. R.; KHAN, O. H.; DA SILVA LOPES, L.; JULIET, P. A. Cerebral white matter oxidation and nitrosylation in young rodents with kaolin-induced hydrocephalus. **J Neuropathol Exp Neurol**, 71, n. 4, p. 274-288, Apr 2012.

DEL BIGIO, M. R.; WILSON, M. J.; ENNO, T. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. **Ann Neurol**, 53, n. 3, p. 337-346, Mar 2003.

DEL BIGIO, M. R.; ZHANG, Y. W. Cell death, axonal damage, and cell birth in the immature rat brain following induction of hydrocephalus. **Exp Neurol**, 154, n. 1, p. 157-169, Nov 1998.

DI CURZIO, D. L. Animal models of hidrocephalus. **Open Journal of Modern Neurosurgery**. 8: 57-71 p. 2018.

DI ROCCO, C.; FRASSANITO, P. Hydrocephalus: Generalities and clinical presentations. *In*: SPRINGER (Ed.). **Textbook of Pediatric Neurosurgery**, 2019. p. 1-46.

DING, P.; REN, D.; HE, S.; HE, M. *et al.* Sirt1 mediates improvement in cognitive defects induced by focal cerebral ischemia following hyperbaric oxygen preconditioning in rats. **Physiol Res**, 66, n. 6, p. 1029-1039, 12 20 2017.

DOMACHEVSKY, L.; RACHMANY, L.; BARAK, Y.; RUBOVITCH, V. *et al.* Hyperbaric oxygen-induced seizures cause a transient decrement in cognitive function. **Neuroscience**, 247, p. 328-334, Sep 05 2013.

EDWARDS, M. L. Hyperbaric oxygen therapy. Part 1: history and principles. **J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)**, 20, n. 3, p. 284-288, Jun 2010.

ESKANDARI, R.; HARRIS, C. A.; MCALLISTER, J. P. Reactive astrocytosis in feline neonatal hydrocephalus: acute, chronic, and shunt-induced changes. **Childs Nerv Syst**, 27, n. 12, p. 2067-2076, Dec 2011.

FAWCETT, J. W.; ASHER, R. A. The glial scar and central nervous system repair. **Brain Res Bull**, 49, n. 6, p. 377-391, Aug 1999.

FEMI-AKINLOSOTU, O. M.; SHOKUNBI, M. T. Changes in Neuronal Density of the Sensorimotor Cortex and Neurodevelopmental Behaviour in Neonatal Mice with Kaolin-Induced Hydrocephalus. **Pediatr Neurosurg**, 55, n. 5, p. 244-253, 2020.

FILHO, E. T. A.; ALMEIDA, K. G.; REIS, G. D. C.; COSTA, G. R. *et al.* Cost analysis in patients admitted to the Santa Casa Misericórdia de Campo Grande, treated with and without the aid of hyperbaric oxygen therapy. **Brazilian Journal of Plastic Surgery**, 29, n. 4, p. 562-566, 2014.

FINCH, C. A.; LENFANT, C. Oxygen transport in man. **N Engl J Med**, 286, n. 8, p. 407-415, Feb 1972.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, 408, n. 6809, p. 239-247, Nov 09 2000.

FISCHER, I.; BARAK, B. Molecular and Therapeutic Aspects of Hyperbaric Oxygen Therapy in Neurological Conditions. **Biomolecules**, 10, n. 9, 08 27 2020.

FREIBERGER, J. J.; SULIMAN, H. B.; SHENG, H.; MCADOO, J. *et al.* A comparison of hyperbaric oxygen versus hypoxic cerebral preconditioning in neonatal rats. **Brain Res**, 1075, n. 1, p. 213-222, Feb 23 2006.

FULTZ, N. E.; BONMASSAR, G.; SETSOMPOP, K.; STICKGOLD, R. A. *et al.* Coupled electrophysiological, hemodynamic, and cerebrospinal fluid oscillations in human sleep. **Science**, 366, n. 6465, p. 628-631, 11 01 2019.

GAO, Z. X.; RAO, J.; LI, Y. H. Hyperbaric oxygen preconditioning improves postoperative cognitive dysfunction by reducing oxidant stress and inflammation. **Neural Regen Res**, 12, n. 2, p. 329-336, Feb 2017.

GARCIA, C. A. B.; CATALÃO, C. H. R.; MACHADO, H. R.; JÚNIOR, I. M. *et al.* Edaravone reduces astrogliosis and apoptosis in young rats with kaolin-induced hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, 33, n. 3, p. 419-428, Mar 2017.

GARCÍA-COVARRUBIAS, L.; CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E. [Hyperbaric oxygenation therapy, basic concepts]. **Gac Med Mex**, 136, n. 1, p. 45-56, 2000 Jan-Feb 2000.

GIROTTI, M. E.; SINGH, R. R.; RODGERS, B. M. The ventriculo-gallbladder shunt in the treatment of refractory hydrocephalus: a review of the current literature. **Am Surg**, 75, n. 8, p. 734-737, Aug 2009.

GONZALES-PORTILLO, B.; LIPPERT, T.; NGUYEN, H.; LEE, J. Y. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy: A new look on treating stroke and traumatic brain injury. **Brain Circ**, 5, n. 3, p. 101-105, 2019 Jul-Sep 2019.

GUSEL'NIKOVA, V. V.; KORZHEVSKIY, D. E. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. **Acta Naturae**, 7, n. 2, p. 42-47, 2015 Apr-Jun 2015.

HADANNY, A.; RITTBLAT, M.; BITTERMAN, M.; MAY-RAZ, I. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy improves neurocognitive functions of post-stroke patients - a retrospective analysis. **Restor Neurol Neurosci**, 38, n. 1, p. 93-107, 2020.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, 355, n. 9210, p. 1179-1180, Apr 01 2000.

HAYNES, I. S. I. Congenital Internal Hydrocephalus: Its Treatment by Drainage of the Cisterna Magna into the Cranial Sinuses. **Ann Surg**, 57, n. 4, p. 449-484, Apr 1913.

HENRY, P.; RECH, F. V. Relatório da Primeira Conferência Brasileira de Consenso em Medicina Hiperbárica: Recomendações para aplicações clínicas e prática de tratamento com oxigênio hiperbárico. **Diretrizes de Segurança, Qualidade & Ética**. SBMH, 2019.

HENZI, R.; VÍO, K.; JARA, C.; JOHANSON, C. E. *et al.* Neural stem cell therapy of foetal onset hydrocephalus using the HTx rat as experimental model. **Cell Tissue Res**, 381, n. 1, p. 141-161, Jul 2020.

HLADKY, S. B.; BARRAND, M. A. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. **Fluids Barriers CNS**, 11, n. 1, p. 26, 2014.

HU, Q.; VAKHMJANIN, A.; LI, B.; TANG, J. *et al.* Hyperbaric oxygen therapy fails to reduce hydrocephalus formation following subarachnoid hemorrhage in rats. **Med Gas Res**, 4, p. 12, 2014.

HUANG, L.; OBENAU, A. Hyperbaric oxygen therapy for traumatic brain injury. **Med Gas Res**, 1, n. 1, p. 21, 2011.

IADECOLA, C.; FORSTER, C.; NOGAWA, S.; CLARK, H. B. *et al.* Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia. **Acta Neuropathol**, 98, n. 1, p. 9-14, Jul 1999.

INGRAHAM, F. D.; ALEXANDER, E.; MATSON, D. D. Experimental hydrocephalus. **J Neurosurg**, 4, n. 2, p. 164-176, Mar 1947.

INGRAHAM, F. D.; CAMPBELL, J. B. An apparatus for closed drainage of ventricular systems 114, p. 1096-1098, 1941.

JADHAV, V.; OSTROWSKI, R. P.; TONG, W.; MATUS, B. *et al.* Cyclo-oxygenase-2 mediates hyperbaric oxygen preconditioning-induced neuroprotection in the mouse model of surgical brain injury. **Stroke**, 40, n. 9, p. 3139-3142, Sep 2009.

JHA, N. K.; JHA, S. K.; SHARMA, R.; KUMAR, D. *et al.* Hypoxia-Induced Signaling Activation in Neurodegenerative Diseases: Targets for New Therapeutic Strategies. **J Alzheimers Dis**, 62, n. 1, p. 15-38, 2018.

JOHANSON, C. E.; DUNCAN, J. A.; KLINGE, P. M.; BRINKER, T. *et al.* Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. **Cerebrospinal Fluid Res**, 5, p. 10, May 2008.

JONES, H. M.; HUSSAIN, R.; LEACH, P. Patient dependant on ventriculo-atrial shunt after 49 years. **Br J Neurosurg**, 29, n. 4, p. 587-588, 2015.

JUGÉ, L.; PONG, A. C.; BONGERS, A.; SINKUS, R. *et al.* Changes in Rat Brain Tissue Microstructure and Stiffness during the Development of Experimental Obstructive Hydrocephalus. **PLoS One**, 11, n. 2, p. e0148652, 2016.

KAUR, J.; FAHMY, L. M.; DAVOODI-BOJD, E.; ZHANG, L. *et al.* Waste Clearance in the Brain. **Front Neuroanat**, 15, p. 665803, 2021.

KAUSCH, W. The treatment of hydrocephalus in infants [Die Behandlung des Hydrocephalus del Kleinen Kinder]. **Langenbecks Archiv für Klinische Chirurgie**, 87, p. 709-796, 1908.

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

KHASAWNEH, A. H.; GARLING, R. J.; HARRIS, C. A. Cerebrospinal fluid circulation: What do we know and how do we know it? **Brain Circ**, 4, n. 1, p. 14-18, 2018 Jan-Mar 2018.

KIEFER, M.; EYMANN, R.; VON TILING, S.; MÜLLER, A. *et al.* The ependyma in chronic hydrocephalus. **Childs Nerv Syst**, 14, n. 6, p. 263-270, Jun 1998.

KIM, K. K.; ADELSTEIN, R. S.; KAWAMOTO, S. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. **J Biol Chem**, 284, n. 45, p. 31052-31061, Nov 2009.

KIM, K. K.; NAM, J.; MUKOUYAMA, Y. S.; KAWAMOTO, S. Rbfox3-regulated alternative splicing of Numb promotes neuronal differentiation during development. **J Cell Biol**, 200, n. 4, p. 443-458, Feb 2013.

KNIERIM, J. J. The hippocampus. **Curr Biol**, 25, n. 23, p. R1116-1121, Dec 2015.

KOUSHI, M.; KATSANIS, N. The Genetic Basis of Hydrocephalus. **Annu Rev Neurosci**, 39, p. 409-435, 07 2016.

KRIEBEL, R. M.; MCALLISTER, J. P. Pathology of the hippocampus in experimental feline infantile hydrocephalus. **Neurol Res**, 22, n. 1, p. 29-36, Jan 2000.

LACROIX, S.; RIVEST, S. Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. **J Neurochem**, 70, n. 2, p. 452-466, Feb 1998.

LAM, S.; HARRIS, D.; ROCQUE, B. G.; HAM, S. A. Pediatric endoscopic third ventriculostomy: a population-based study. **J Neurosurg Pediatr**, 14, n. 5, p. 455-464, Nov 2014.

LAVRNJA, I.; PARABUCKI, A.; BRKIC, P.; JOVANOVIĆ, T. *et al.* Repetitive hyperbaric oxygenation attenuates reactive astrogliosis and suppresses expression of inflammatory mediators in the rat model of brain injury. **Mediators Inflamm**, 2015, p. 498405, 2015.

LEE, H. H.; PARK, S. C.; CHOE, I. S.; KIM, Y. *et al.* Time Course and Characteristics of Astrocyte Activation in the Rat Brain after Injury. **Korean J Neurotrauma**, 11, n. 2, p. 44-51, Oct 2015.

LEINONEN, V.; VANNINEN, R.; RAURAMAA, T. Cerebrospinal fluid circulation and hydrocephalus. **Handb Clin Neurol**, 145, p. 39-50, 2017.

LEISING, K. J.; BLAISDELL, A. P. Associative Basis of Landmark Learning and Integration in Vertebrates. **Comp Cogn Behav Rev**, 4, p. 80-102, Jan 01 2009.

LEKIC, T.; MANAENKO, A.; ROLLAND, W.; OSTROWSKI, R. P. *et al.* Beneficial effect of hyperbaric oxygenation after neonatal germinal matrix hemorrhage. **Acta Neurochir Suppl**, 111, p. 253-257, 2011.

LI, J.; LIU, W.; DING, S.; XU, W. *et al.* Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against brain ischemia-reperfusion injury by upregulation of antioxidant enzymes in rats. **Brain Res**, 1210, p. 223-229, May 2008.

LIMA, B. O. **Comparação dos custos e benefícios do tratamento da hidrocefalia com implante de válvula e com cirurgia neuroendoscópica**. Tese (Doutorado)- Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2014. DOI 10.26512/2015.02.T.18207. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/18207?locale=fr>. Acesso em: 15 jun. 2021.

LISKA, G. M.; LIPPERT, T.; RUSSO, E.; NIEVES, N. *et al.* A Dual Role for Hyperbaric Oxygen in Stroke Neuroprotection: Preconditioning of the Brain and Stem Cells. **Cond Med**, 1, n. 4, p. 151-166, Jun 2018.

LIU, H.; YANG, M.; PAN, L.; LIU, P. *et al.* Hyperbaric Oxygen Intervention Modulates Early Brain Injury after Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rats: Possible Involvement of TLR4/NF- κ B-Mediated Signaling Pathway. **Cell Physiol Biochem**, 38, n. 6, p. 2323-2336, 2016.

LIU, S.; LIU, Y.; DENG, S.; GUO, A. *et al.* Beneficial effects of hyperbaric oxygen on edema in rat hippocampus following traumatic brain injury. **Exp Brain Res**, 233, n. 12, p. 3359-3365, Dec 2015.

LIU, W. C.; YANG, S. N.; WU, C. W.; CHEN, L. W. *et al.* Hyperbaric Oxygen Therapy Alleviates Carbon Monoxide Poisoning-Induced Delayed Memory Impairment by Preserving Brain-Derived Neurotrophic Factor-Dependent Hippocampal Neurogenesis. **Crit Care Med**, 44, n. 1, p. e25-39, Jan 2016.

LIU, X. H.; YAN, H.; XU, M.; ZHAO, Y. L. *et al.* Hyperbaric oxygenation reduces long-term brain injury and ameliorates behavioral function by suppression of apoptosis in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. **Neurochem Int**, 62, n. 7, p. 922-930, Jun 2013.

LOPES, L.; SLOBODIAN, I.; DEL BIGIO, M. Characterization of juvenile and young adult mice following induction of hydrocephalus with kaolin. **Exp Neurol**, 219, n. 1, p. 187-196, Sep 2009.

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

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

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

LU, L.; CHEN, H.; WENG, S.; XU, Y. Endoscopic Third Ventriculostomy versus Ventriculoperitoneal Shunt in Patients with Obstructive Hydrocephalus: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **World Neurosurg**, May 2019.

LUCCAS, V.; SAMPAIO, D.; GRILLO, F.; JÚNIOR, J. *et al.* Ultrasound technique to evaluate hydrocephalus in newborns. **Revista Brasileira de Física Médica**, 3, 9, p. 15-18, 2015.

MADER, J. T.; BROWN, G. L.; GUCKIAN, J. C.; WELLS, C. H. *et al.* A mechanism for the amelioration by hyperbaric oxygen of experimental staphylococcal osteomyelitis in rabbits. **J Infect Dis**, 142, n. 6, p. 915-922, Dec 1980.

MARX, R. E.; EHLER, W. J.; TAYAPONGSAK, P.; PIERCE, L. W. Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue. **Am J Surg**, 160, n. 5, p. 519-524, Nov 1990.

MASET, A. L.; PINTO, J. R. C.; ANDRADE, J. R.; XAVIER, V. E. F. Hydrodynamic considerations on CSF derivation. Part IV: Valve Technology - **First Generation**. 3, 28, p. 87-96, 2009.

MATCHETT, G. A.; MARTIN, R. D.; ZHANG, J. H. Hyperbaric oxygen therapy and cerebral ischemia: neuroprotective mechanisms. **Neurol Res**, 31, n. 2, p. 114-121, Mar 2009.

MATSON, D. D. A new operation for the treatment of communicating hydrocephalus; report of a case secondary to generalized meningitis. **J Neurosurg**, 6, n. 3, p. 238-247, May 1949.

MCMONNIES, C. Reactive oxygen species, oxidative stress, glaucoma and hyperbaric oxygen therapy. **J Optom**, 11, n. 1, p. 3-9, 2018 Jan - Mar 2018.

MEDINA, S. A. P.; FRANCO, J. V.; CIAPPONI, A.; GARROTE, V. *et al.* Ventriculo-peritoneal shunting devices for hydrocephalus. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2017.

MIGITA, H.; YOSHITAKE, S.; TANGE, Y.; CHOIJOOKHUU, N. *et al.* Hyperbaric Oxygen Therapy Suppresses Apoptosis and Promotes Renal Tubular Regeneration After Renal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. **Nephrourol Mon**, 8, n. 1, p. e34421, Jan 2016.

MITCHELL, K. S.; ZELKO, I.; SHAY, T.; HOREN, S. *et al.* The Impact of Hydrocephalus Shunt Devices on Quality of Life. **J Craniofac Surg**, 32, n. 5, p. 1746-1750, 2021 Jul-Aug 01 2021.

MORAN, D.; KOSZTOWSKI, T. A.; JUSUÉ-TORRES, I.; ORKOULAS-RAZIS, D. *et al.* Does CT wand guidance improve shunt placement in patients with hydrocephalus? **Clin Neurol Neurosurg**, 132, p. 26-30, May 2015.

MORI, K.; MIYAKE, H.; KURISAKA, M.; SAKAMOTO, T. Immunohistochemical localization of superoxide dismutase in congenital hydrocephalic rat brain. **Childs Nerv Syst**, 9, n. 3, p. 136-141, Jun 1993.

MRSIĆ-PELCIĆ, J.; PELCIĆ, G.; VITEZIĆ, D.; ANTONCIĆ, I. *et al.* Hyperbaric oxygen treatment: the influence on the hippocampal superoxide dismutase and Na⁺,K⁺-ATPase activities in global cerebral ischemia-exposed rats. **Neurochem Int**, 44, n. 8, p. 585-594, Jun 2004.

NITA, D. A.; NITA, V.; SPULBER, S.; MOLDOVAN, M. *et al.* Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion - a biochemical study in rat. **J Cell Mol Med**, 5, n. 2, p. 163-170, 2001 Apr-Jun 2001.

NULSEN, F. E.; SPITZ, E. B. Treatment of hydrocephalus by direct shunt from ventricle to jugular vein. **Surg Forum**, p. 399-403, 1951.

OHTAKI, H.; DOHI, K.; NAKAMACHI, T.; YOFU, S. *et al.* Evaluation of brain ischemia in mice. **Acta Histochemica et Cytochemica**.38: 99-106 p. 2005.

OI, S. Classification of hydrocephalus: critical analysis of classification categories and advantages of "Multi-categorical Hydrocephalus Classification" (Mc HC). **Childs Nerv Syst**, 27, n. 10, p. 1523-1533, Oct 2011.

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

OSHIO, K.; WATANABE, H.; SONG, Y.; VERKMAN, A. S. *et al.* Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. **FASEB J**, 19, n. 1, p. 76-78, Jan 2005.

PALZUR, E.; ZAAROOR, M.; VLODAVSKY, E.; MILMAN, F. *et al.* Neuroprotective effect of hyperbaric oxygen therapy in brain injury is mediated by preservation of mitochondrial membrane properties. **Brain Res**, 1221, p. 126-133, Jul 2008.

PASSINI, J. R.; NÓBREGA, S. P.; CECATTI, J. G.; BARINI, R. *et al.* Diagnóstico, conduta obstétrica e resultados perinatais em fetos com hidrocefalia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 7, 20, p. 381-387, 1998.

PATEL, S. K.; TARI, R.; MANGANO, F. T. Pediatric Hydrocephalus and the Primary Care Provider. **Pediatr Clin North Am**, 68, n. 4, p. 793-809, Aug 2021.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Academic Press, 2007. 456 p. (Hard Cover Edition).

PENG, Y.; FENG, S. F.; WANG, Q.; WANG, H. N. *et al.* Hyperbaric oxygen preconditioning ameliorates anxiety-like behavior and cognitive impairments via upregulation of thioredoxin reductases in stressed rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 34, n. 6, p. 1018-1025, Aug 2010.

PENG, Z.; XIAO, P.; GUO, H.; LIU, Q. Effect of early hyperbaric oxygen on neuronal apoptosis and learning and memory of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, 34, n. 6, p. 468-475, Jun 2009.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**, 97, p. 55-74, Jun 05 2015.

PODGÓRSKA-BEDNARZ, J.; PERENC, L. Hyperbaric Oxygen Therapy for Children and Youth with Autism Spectrum Disorder: A Review. **Brain Sci**, 11, n. 7, Jul 11 2021.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I.; TUDERMAN, L.; GUZMAN, N. A. The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). **N Engl J Med**, 301, n. 1, p. 13-23, Jul 1979.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, 463, n. 1-3, p. 3-33, Feb 2003.

ROCHA CATALÃO, C. H.; LEME CORREA, D. A.; BERNARDINO GARCIA, C. A.; DOS SANTOS, A. C. *et al.* Pre- and postshunting magnetization transfer ratios are in accordance with neurological and behavioral changes in hydrocephalic immature rats. **Dev Neurosci**, 36, n. 6, p. 520-531, 2014.

ROMEIRO, Thaís Helena. **Avaliação da resposta ao tratamento com Edaravone em ratos jovens hidrocefálicos submetidos ou não à derivação líquórica**. 2021. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021. DOI 10.11606/T.17.2021. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17137/tde-05072021-162405/es.php>. Acesso em: 08 set. 2021.

SAMPAIO, G. B.; DA SILVA, S. C.; ROMEIRO, T. H.; BEGGIORA, P. D. S. *et al.* Evaluation of the effects of quercetin on brain lesions secondary to experimental hydrocephalus in rats. **Childs Nerv Syst**, 35, n. 12, p. 2299-2306, Dec 2019.

SANTOS, M. V.; GARCIA, C. A.; JARDINI, E. O.; ROMEIRO, T. H. *et al.* Ventricular-subcutaneous shunt for the treatment of experimental hydrocephalus in young rats: technical note. **Childs Nerv Syst**, 32, n. 8, p. 1507-1511, Aug 2016.

SANTOS, M. V.; LOPES, L. S.; MACHADO, H. R.; OLIVEIRA, R. S. Behavioral and Biochemical Features of the Course and Surgical Treatment of Experimental Obstructive Hydrocephalus in Young Rats. **Dev Neurosci**, p. 1-10, Apr 2019.

SEIBERT, K.; MASFERRER, J.; ZHANG, Y.; GREGORY, S. *et al.* Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. **Agents Actions Suppl**, 46, p. 41-50, 1995.

SHYTLE, R. D.; EVE, D. J.; KIM, S. H.; SPIEGEL, A. *et al.* Retrospective Case Series of Traumatic Brain Injury and Post-Traumatic Stress Disorder Treated with Hyperbaric Oxygen Therapy. **Cell Transplant**, 28, n. 7, p. 885-892, 07 2019.

SILVER, J. The glial scar is more than just astrocytes. **Exp Neurol**, 286, p. 147-149, 12 2016.

SMOLINSKY, A. N.; BERGNER, C. L.; LAPORTE, J. L.; KALUEFF, A. V. **Analysis of Grooming Behavior and Its Utility in Studying Animal Stress, Anxiety, and Depression.** In: Gould T. (eds) **Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice.** Humana Press, Totowa, NJ. : 2009.

SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci**, 32, n. 12, p. 638-647, Dec 2009.

SOMAA, F. A Review of the Application of Hyperbaric Oxygen Therapy in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, 81, n. 4, p. 1361-1367, 2021.

STOKUM, J. A.; GERZANICH, V.; SIMARD, J. M. Molecular pathophysiology of cerebral edema. **J Cereb Blood Flow Metab**, 36, n. 3, p. 513-538, Mar 2016.

STEPIEŃ, K.; OSTROWSKI, R. P.; MATYJA, E. Hyperbaric oxygen as an adjunctive therapy in treatment of malignancies, including brain tumours. **Med Oncol**, 33, n. 9, p. 101, Sep 2016.

SURYANINGTYAS, W.; PARENRENGI, M. A.; BAJAMAL, A. H.; RANTAM, F. A. Lipid Peroxidation Induces Reactive Astrogliosis by Activating WNT/ β -Catenin Pathway in Hydrocephalus. **Malays J Med Sci**, 27, n. 3, p. 34-42, May 2020.

TAVEIRA, K. V.; CARRARO, K. T.; CATALÃO, C. H.; LOPES, L. A. S. Morphological and morphometric analysis of the hippocampus in Wistar rats with experimental hydrocephalus. **Pediatr Neurosurg**, 48, n. 3, p. 163-167, 2012.

THIONG'O, G. M.; LUZZIO, C.; ALBRIGHT, A. L. Ventriculoperitoneal shunt perforations of the gastrointestinal tract. **J Neurosurg Pediatr**, 16, n. 1, p. 36-41, Jul 2015.

THOM, S. R. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. **Plast Reconstr Surg**, 127 Suppl 1, p. 131S-141S, Jan 2011.

THOMAS, W. S. EXPERIMENTAL HYDROCEPHALUS. **J Exp Med**, 19, n. 1, p. 106-120, Jan 1914.

TIDA, J. A.; CATALÃO, C. H. R.; GARCIA, C. A. B.; DOS SANTOS, A. C. *et al.* Acupuncture at ST36 exerts neuroprotective effects via inhibition of reactive astrogliosis in infantile rats with hydrocephalus. **Acupunct Med**, 36, n. 6, p. 386-393, 12 2018.

TIPPETT, L. J.; WALDVOGEL, H. J.; THOMAS, S. J.; HOGG, V. M. *et al.* Striosomes and mood dysfunction in Huntington's disease. **Brain**, 130, n. Pt 1, p. 206-221, Jan 2007.

TORKILDSEN, A. A new palliative procedure in cases of inoperable occlusion of the Sylvian duct. **Acta Chir Scand**, 82, p. 117-124, 1939.

TUMANI, H.; HUSS, A.; BACHHUBER, F. The cerebrospinal fluid and barriers - anatomic and physiologic considerations. **Handb Clin Neurol**, 146, p. 21-32, 2017.

TURGUT, M.; BAKA, M.; UYANIKGIL, Y. Melatonin Attenuates Histopathological Changes in the Hippocampus of Infantile Rats with Kaolin-Induced Hydrocephalus. **Pediatr Neurosurg**, 53, n. 4, p. 229-237, 2018.

UNAL-CEVIK, I.; KILINÇ, M.; CAN, A.; GÜRSOY-OZDEMİR, Y. *et al.* Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. **Stroke**, 35, n. 9, p. 2189-2194, Sep 2004.

VERKMAN, A. S.; TRADTRANTIP, L.; SMITH, A. J.; YAO, X. Aquaporin Water Channels and Hydrocephalus. **Pediatr Neurosurg**, 52, n. 6, p. 409-416, 2017.

VNUKOV, V. V.; GUTSENKO, O. I.; MILYUTINA, N. P.; KORNIENKO, I. V. *et al.* SkQ1 Regulates Expression of Nrf2, ARE-Controlled Genes Encoding Antioxidant Enzymes, and Their Activity in Cerebral Cortex under Oxidative Stress. **Biochemistry (Mosc)**, 82, n. 8, p. 942-952, Aug 2017.

VOLPON SANTOS, M.; DA SILVA LOPES, L.; MACHADO, H. R.; SANTOS DE OLIVEIRA, R. Behavioral and Biochemical Features of the Course and Surgical Treatment of Experimental Obstructive Hydrocephalus in Young Rats. **Dev Neurosci**, p. 1-10, Apr 2019.

WADA, K.; ITO, M.; MIYAZAWA, T.; KATOH, H. *et al.* Repeated hyperbaric oxygen induces ischemic tolerance in gerbil hippocampus. **Brain Res**, 740, n. 1-2, p. 15-20, Nov 18 1996.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, 83, n. 3, p. 482-504, May 1976.

WANG, Y.; GAO, Y.; LU, M.; LIU, Y. Long-term functional prognosis of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage treated with rehabilitation combined with hyperbaric oxygen: Case-series study. **Medicine (Baltimore)**, 99, n. 3, p. e18748, Jan 2020.

WARNER, D. S.; SHENG, H.; BATINIĆ-HABERLE, I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. **J Exp Biol**, 207, n. Pt 18, p. 3221-3231, Aug 2004.

WATTERS, G. V.; PAGE, L.; LORENZO, A. V.; CUTLER, R. W. *et al.* Relationship between cerebrospinal fluid (CSF) formation, absorption and pressure in human hydrocephalus. **Trans Am Neurol Assoc**, 94, p. 153-156, 1969.

WOLBURG, H.; PAULUS, W. Choroid plexus: biology and pathology. **Acta Neuropathol**, 119, n. 1, p. 75-88, Jan 2010.

WONG, T.; GOLD, J.; HOUSER, R.; HERSCHMAN, Y. *et al.* Ventriculopleural shunt: Review of literature and novel ways to improve ventriculopleural shunt tolerance. **J Neurol Sci**, 428, p. 117564, Jul 02 2021.

XU, L.; LI, B.; YANG, C.; LI, C. *et al.* Clinical research on postoperative efficacy and related factors of early simulation hyperbaric oxygen therapy for severe craniocerebral injury. **Pak J Pharm Sci**, 29, n. 1 Suppl, p. 273-280, Jan 2016.

XUE, T.; DING, J. S.; LI, B.; CAO, D. M. *et al.* A narrative review of adjuvant therapy for glioma: hyperbaric oxygen therapy. **Med Gas Res**, 11, n. 4, p. 155-157, 2021 Oct-Dec 2021.

YANG, L.; WANG, X.; LI, Y.; CHEN, L. *et al.* The Clinical Effect of Postoperative Hyperbaric Oxygen Therapy on Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus: A Retrospective and Comparative Analysis of 61 Patients with Ventriculoperitoneal Shunt. **World Neurosurg**, 104, p. 376-380, Aug 2017.

YASAR, M.; YILDIZ, S.; MAS, R.; DUNDAR, K. *et al.* The effect of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress in experimental acute necrotizing pancreatitis. **Physiol Res**, 52, n. 1, p. 111-116, 2003.

YIN, D.; ZHANG, J. H. Delayed and multiple hyperbaric oxygen treatments expand therapeutic window in rat focal cerebral ischemic model. **Neurocrit Care**, 2, n. 2, p. 206-211, 2005.

YIN, D.; ZHOU, C.; KUSAKA, I.; CALVERT, J. W. *et al.* Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model. **J Cereb Blood Flow Metab**, 23, n. 7, p. 855-864, Jul 2003.

YIN, W.; BADR, A. E.; MYCHASKIW, G.; ZHANG, J. H. Down regulation of COX-2 is involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model. **Brain Res**, 926, n. 1-2, p. 165-171, Feb 2002.

ZAGER, E. L.; AMES, A. Reduction of cellular energy requirements. Screening for agents that may protect against CNS ischemia. **J Neurosurg**, 69, n. 4, p. 568-579, Oct 1988.

ZHAI, W. W.; SUN, L.; YU, Z. Q.; CHEN, G. Hyperbaric oxygen therapy in experimental and clinical stroke. **Med Gas Res**, 6, n. 2, p. 111-118, 2016 Apr-Jun 2016.

ZHAO, B.; PAN, Y.; WANG, Z.; XU, H. *et al.* Hyperbaric Oxygen Pretreatment Improves Cognition and Reduces Hippocampal Damage Via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in a Rat Model. **Yonsei Med J**, 58, n. 1, p. 131-138, Jan 2017.

ANEXO 1

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Análise dos efeitos da oxigenoterapia hiperbárica em lesões cerebrais secundárias a hidrocefalia experimental tratada ou não cirurgicamente*”, registrado com o número **214/2017**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Luiza da Silva Lopes**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata*, *subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 26 de março de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 50 ratos Wistar-Old machos pesando 20g e 05 ratos Wistar-Old fêmeas pesando 400g oriundos do Serviço de Biotério da Prefeitura do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Vigência da autorização: 26/03/2018 a 10/05/2021.

We certify that the Protocol *nº 214/2017*, entitled “*Analysis of the effects of hyperbaric oxygen therapy on brain lesions secondary to experimental hydrocephalus treated or non-surgically*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 03/26/2018. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata*, *subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes and includes the use of 50 male Wistar-Old rats weighing 20g and 05 female Wistar-Old rats weighing 400g from Central Animal House of Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo. This certificate is valid until 05/10/2021.

Ribeirão Preto, 26 de março de 2018

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP – USP