UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

THAÍS HELENA ROMEIRO

Hidrocefalia experimental: o Resveratrol apresenta algum
benefício como neuroprotetor?

Ribeirão Preto

2016

THAÍS HELENA ROMEIRO

Hidrocefalia experimental: o Resveratrol apresenta algum
benefício como neuroprotetor?

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

Área de concentração: Morfologia e
Medicina Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Rubens
Machado

Ribeirão Preto

2016

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

Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Romeiro, Thaís Helena.

Hidrocefalia experimental: o Resveratrol apresenta algum benefício como neuroprotetor? / Thaís Helena Romeiro ; orientador Hélio Rubens Machado. – Ribeirão Preto, 2016.

83 f. : il.

Dissertação de Mestrado -- Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2016.

1. Hidrocefalia. 2. Resveratrol. 3. Neuroproteção. 4. Estresse oxidativo.

Nome: ROMEIRO, Thaís Helena

Título: Hidrocefalia experimental: o Resveratrol apresenta algum benefício como neuroprotetor?

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências – Opção:
Morfologia e Medicina Experimental

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. : _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. : _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado às pessoas que sempre estiveram ao meu lado, me acompanhando, apoiando e principalmente acreditando em mim: meus pais Paulo e Sílvia, meu irmão Luís Henrique, minhas irmãs Heloísa e Fernanda e minha tia Sônia. Dedico também a quatro pessoas que sempre foram e serão exemplos de caráter e dignidade, sempre presentes na minha vida: meus avós Adélia e Dorico (in memoriam), Sebastião e Maria Ignês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que todos os dias da minha vida me deu forças para nunca desistir.

Ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto.

Ao meu orientador, Professor Dr. Hélio Rubens Machado, por seu apoio e amizade, além de sua dedicação e competência.

À professora Luiza da Silva Lopes que me mostrou os primeiros passos da pesquisa científica, e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para a conclusão deste trabalho.

À secretária do departamento, Juliana, pela ajuda, paciência e tranquilidade transmitida em todas nossas conversas.

À CAPES, pelo auxílio financeiro, durante esses dois anos.

Ao Laboratório de Neurologia Aplicada e Experimental do Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, e ao Renato, que sempre nos auxiliou.

Ao Rodrigo pela dedicação nas segmentações das imagens de ressonância magnética.

Ao Hermes pela ajuda nas estruturas das aulas apresentadas.

Ao Laboratório das Marias pela colaboração e ajuda com as análises bioquímicas.

À Sandrinha e Jorge sempre nos ajudando nas técnicas histológicas com lanchinhos da tarde apreciando bolachas importadas, chocolates e cappuccino.

Aos colegas do Laboratório de Neurocirurgia Pediátrica e Neuropatologia do Desenvolvimento e aos colegas da Cirurgia Experimental: Evelise, Matheus, Vinícius, Guilherme Rodrigues, Guilherme Silva, Tete, Camila, Ivair, Karine, Pâmella, Dr. Volpon, Dr. Gustavo, Rebeca, Dr. Rodrigo, Gil, Claudinha, Ricardo, Helder, Ronaldo, Carlinho, Vagner, Paulão, Ariane, Paulo, Daniel, Daniele, Rose, Hermes, Mário e Karina.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao amor da minha vida: Eduardo Abib, minha inspiração, meu tudo!

RESUMO

ROMEIRO, T. H. **Hidrocefalia experimental: o Resveratrol apresenta algum benefício como neuroprotetor?**. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A hidrocefalia é uma condição neurológica complexa, em que ocorre o desequilíbrio na dinâmica do líquido cefalorraquidiano (LCR) provocando um distúrbio na produção, circulação e reabsorção do mesmo, o que pode levar a uma redução e/ou bloqueio do fluxo sanguíneo. Apesar do tratamento com derivação líquórica ser eficiente na redução da ventriculomegalia, muitos danos neurológicos não são revertidos com a cirurgia. Estudos demonstram que o estresse oxidativo está envolvido na gênese das lesões da hidrocefalia. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta neuroprotetora do Resveratrol, reconhecido como um potente antioxidante, na hidrocefalia experimental induzida em ratos Wistar jovens. Foram utilizados ratos machos, com sete dias de vida, que receberam uma injeção de caulim a 15% na cisterna magna para indução da hidrocefalia. Esses animais foram divididos em grupo hidrocefálico sem tratamento (n=20), grupo hidrocefálico tratado com Resveratrol através de aplicação de injeção intraperitoneal (20mg/kg/dia) (n=20) e um grupo de animais que não receberam a injeção de caulim para ser usado como controle (n=10). Foram realizadas avaliações comportamentais e estudos de ressonância magnética. Duas semanas após, os animais foram eutanasiados para coleta dos encéfalos, e realizados testes histológicos, imunoistoquímicos e bioquímicos. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os animais hidrocefálicos, que receberam diariamente injeção de Resveratrol, apresentaram efeito benéfico nos testes comportamentais mostrando mais agilidade e melhor exploração do ambiente, melhor desenvolvimento sensoriomotor, aprendizagem e capacidade de memorização, apresentaram também discreta diminuição da atividade astrocitária evidenciada pela imunomarcagem do GFAP no corpo caloso e exibiram aumento significativo na quantidade de antioxidantes totais no plasma. Conclui-se que o uso do Resveratrol diminuiu a atividade astrocitária, aumentou a quantidade de antioxidantes e melhorou a memória e o desenvolvimento motor dos ratos.

Palavras-chave: Hidrocefalia. Resveratrol. Neuroproteção. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

ROMEIRO, T. H. **Experimental hydrocephalus: Resveratrol has some benefit as a neuroprotective?**. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Hydrocephalus is a neurological condition complex, wherein the imbalance occurs in the dynamics of cerebrospinal fluid (CSF) causing a disturbance in the production, circulation and absorption thereof, which can lead to a reduction and / or blockage of blood flow. Despite treatment with CSF shunt be effective in reducing ventriculomegaly, many neurological damage is not reversed with surgery. Studies have shown that oxidative stress is involved in the genesis of hydrocephalus injuries. The objective of this study was to evaluate the neuroprotective response Resveratrol, recognized as a potent antioxidant in experimentally induced hydrocephalus in young Wistar rats. male rats were used with seven days of life, which received a 15% kaolin injection into the cisterna magna induction of hydrocephalus. These animals were divided into hidrocefálico untreated group (n = 20), hidrocefálico group treated with resveratrol by intraperitoneal injection application (20 mg / kg / day) (n = 20) and a group of animals that received the kaolin injection to be used as control (n = 10). behavioral assessments and magnetic resonance studies were performed. Two weeks later, the animals were euthanized to collect the brains and performed histological, immunohistochemical and biochemical tests. The results of this study showed that hidrocefálicos animals that received daily injection of Resveratrol showed beneficial effect on behavioral tests showing more agility and better exploitation of the environment, better sensorimotor development, learning and memory capacity, also showed a slight decrease of astrocyte activity evidenced by immunostaining of GFAP in the corpus callosum and exhibited a significant increase in the total amount of antioxidants in plasma. We conclude that the use of Resveratrol decreased the astrocyte activity, increased the amount of antioxidants and improved memory and motor development of mice.

Keywords: Hydrocephalus. Resveratrol. Neuroprotection. Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - A: Indução da hidrocefalia. Auxiliar posiciona o rato e o pesquisador realiza a punção percutânea na cisterna magna com injeção de caolim (Merck®); B: Rato hidrocefálico em P14 (21 dias de vida).....30
- Figura 2 - Parâmetros detalhados do protocolo para aquisição das imagens de RM, nas sequências ponderadas de T2 e MTR.....34
- Figura 3 - Imagem obtida por RM, sequência em T2, em reconstrução coronal média, com delimitação das áreas de interesse (ROI) (Azul: ROI dorsal ao ventrículo lateral / Violeta: ROI ventral ao ventrículo lateral) utilizadas para quantificação da mielina e delimitação das áreas do encéfalo e, ventrículos laterais, para cálculo da razão ventricular (Área vermelha: ventrículo lateral / Área verde: parênquima encefálico).....35
- Figura 4 - Fotomicrografias de lâminas coradas com hematoxilina e eosina na região do corpo caloso: A: controle, C: hidrocefálico não tratado e E: hidrocefálico tratado com Resveratrol. Na região da matriz germinativa: B: controle, D: hidrocefálico não tratado e F: hidrocefálico tratado com Resveratrol. Observam-se sinais de esgarçamento e edema nos animais hidrocefálicos. Entretanto, estes sinais de lesão são mais intensos nos animais HNT (B e E: setas) que nos animais HTR (C e F: *). Objetiva de 10X. Barra 100um.....51
- Figura 5 - Fotomicrografias, por coloração com solocromo-cianina, da região do corpo caloso dos ratos com 21 dias de vida: A: controle. B: hidrocefálico não tratado. C: hidrocefálico tratado com Resveratrol. Observa-se maior espessura e tonalidade em azul no corpo caloso dos animais controles quando comparados com os grupos hidrocefálicos. Os animais dos grupos HNT e HTR não apresentaram diferenças nesses quesitos. Objetiva de 20X. Barra – 100 µm (*)......53
- Figura 6 - Fotomicrografias de lâminas imunomarcadas para GFAP na região do corpo caloso. A: controle, C: hidrocefálico não tratado e E: hidrocefálico tratado com Resveratrol. Região da matriz germinativa: B: controle, D: hidrocefálico não tratado e F: hidrocefálico tratado com Resveratrol. O grupo HNT apresentou mais astrócitos reativos, com prolongamentos grossos quando comparados com os outros grupos experimentais. Objetiva de 40X. Barra 20um.....55
- Figura 7 - Fotomicrografias de lâminas imunomarcadas para Ki67 na região da matriz germinativa. A: controle, B: hidrocefálico não tratado e C: hidrocefálico tratado com Resveratrol. Grupo controle com maior número de células marcadas (setas) quando comparados com os outros grupos experimentais. Objetiva de 40X. Barra 20um.....58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Média de pesos diários dos três grupos experimentais. O peso inicial foi semelhante nos três grupos estudados. No P1, os animais do grupo HTR apresentaram perda de peso, enquanto os ratos dos outros dois grupos tiveram ganho ponderal. O grupo HNT e C apresentaram ganhos semelhantes durante os 14 dias de experimento, apresentando diferenças significativas quando comparados com o grupo tratado com Resveratrol.....42

Gráfico 2 - Variação de peso ao longo do experimento. A: P0 ao P7: grupo controle apresentou maior ganho de peso quando comparado com os grupos HNT ($p<0,05$) e HTR ($p<0,01$). O grupo HNT ganhou mais peso que o grupo HTR ($p<0,01$). B: P7 ao P14: apesar da desaceleração do ganho de peso dos animais C, e aumento de peso dos animais HTR, não houve diferença estatística. C: P0 ao P14: houve diferença significativa entre o grupo C e HTR, e entre o grupo C e HNT ($p<0,01$).....43

Gráfico 3 - Desempenho dos animais no teste de *Open Field*. A: em P06 os animais C e HTR estavam semelhantes. B: em P10 os animais do grupo HNT demoraram mais para alcançar a plataforma quando comparados com os outros dois grupos. C: em P12 os grupos C e HNT apresentaram diferença significativa ($p<0,05$). D: em P14 houve diferença estatística entre o grupo HTR com o grupo HNT ($p<0,05$), já o grupo C e HTR estavam semelhantes.....45

Gráfico 4 - Média dos tempos obtidos no teste *water maze*. A: em P10, no período da manhã, os animais do grupo C se mostraram mais rápidos para alcançar a plataforma quando comparados com os outros dois grupos, porém sem diferença significativa. B: em P10, no período da tarde, os animais do grupo HTR mostraram um desempenho melhor, porém sem diferença significativa. C: em P11, durante o período da manhã, houve diferença significativa ($p<0,05$) apenas entre os grupos C e HNT. D: no teste em P11, no período da tarde, os animais HNT, apesar da melhora, ainda estavam com dificuldade para alcançar a plataforma quando comparados com os outros grupos.....46

Gráfico 5 - Desempenho dos animais C, HNT e HTR no teste de *water maze*. Observa-se que os animais controles passaram a levar menos tempo para atingir a plataforma no segundo dia de teste, enquanto que os animais tratados com Resveratrol já demonstravam ter aprendido onde estava a plataforma. Por outro lado, os animais não tratados levaram muito mais tempo para aprender o mesmo e ainda apresentavam um tempo maior para achar a plataforma. O tempo para atingir a plataforma começou a reduzir discretamente no segundo teste do segundo dia.....47

Gráfico 6 - Semelhança da razão ventricular entre os grupos HNT e HTR. Diferença estatística entre os dois grupos hidrocefálicos quando comparados com o grupo C ($p<0,01$).....48

Gráfico 7 - Transferência de magnetização do encéfalo no corte coronal. A: transferência de magnetização do encéfalo total. B: transferência de magnetização da razão subcortical dorsal. C: transferência de magnetização da razão subcortical ventral, não apresentando diferenças estatísticas em nenhum dos critérios apresentados.....49

Gráfico 8 - Espessura do corpo caloso. Diferenças significativas ($p<0,05$) entre os grupos C e HNT e entre os grupos C e HTR.....52

Gráfico 9 - Categorização por escore das lâminas imunomarcadas para GFAP. A: região do corpo caloso e B: região da matriz germinativa, onde ambas apresentaram maior reação astrocitária no grupo não tratado, exibindo diferenças estatísticas apenas entre os animais C e os HNT ($p < 0,05$).....56

Gráfico 10 - Densidade de astrócitos intensamente marcados na região do corpo caloso. Observou-se maior quantidade de astrócitos nos animais não tratados, com diferença estatística entre os grupos C e HNT ($p < 0,05$) e entre os grupos HNT e HTR ($p < 0,01$). Região da matriz germinativa sem diferença significativa entre os grupos.....57

Gráfico 11 - Médias entre os grupos experimentais referentes à densidade de células em divisão mitótica. Observa-se diferenças significativas ($p < 0,01$) entre o grupo controle quando comparados com os dois grupos hidrocefálicos.....59

Gráfico 12 - Capacidade total de antioxidantes. Observa-se aumento significativo na quantidade de antioxidantes presentes no plasma dos animais HTR quando comparados com os animais do grupo HNT ($p < 0,05$). Os valores obtidos representam a absorbância.....60

Gráfico 13 - Dosagem de radicais livres no tecido cerebral medidas através da dosagem de Malondialdeído pelo teste TBARS. Os três grupos não apresentaram diferenças significativas.....61

Gráfico 14 - Dosagem de glutathiona medida através da atividade GPx. Os três grupos não apresentaram diferenças significativas na ação da enzima glutathiona peroxidase.....62

LISTA DE SIGLAS

AC	Área do cérebro
AVL	Área do ventrículo lateral
C	Controle
CAT	Catalase
CETEA	Comissão de Ética em experimentação animal
COBEA	Colégio Brasileiro de experimentação animal
DAB	Acid protein diaminobenzidina
DVE	Derivação ventricular externa
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GFAP	Glial fibrillary
GPx	Glutathione Peroxidase
HE	Hematoxilina e eosina
HNT	Hidrocefálicos não tratados
HTR	Hidrocefálicos tratados com Resveratrol
MDA	Malondialdeído
MTR	Transferência de magnetização
OMS	Organização mundial de saúde
PIC	Pressão intra craniana
ROI	Área de interesse
RV	Razão ventricular
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1 HIDROCEFALIA	17
1.1 HIDROCEFALIA EXPERIMENTAL	19
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO	19
1.3 NEUROPROTEÇÃO E RESVERATROL	21
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 INDUÇÃO DA HIDROCEFALIA	29
4.2 COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	30
4.3 ADMINISTRAÇÃO DO RESVERATROL	31
4.4 ESTUDOS COMPORTAMENTAIS	31
4.5 ESTUDOS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	33
4.6 COLETA DAS AMOSTRAS: PERFUSÃO CEREBRAL E DISSECÇÃO DE ESTRUTURAS	35
4.7 ANÁLISES HISTOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA	36
4.8 ANÁLISE BIOQUÍMICA	37
4.9 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA	38
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
5 RESULTADOS	41
5.1 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL	41
5.2 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL GERAL	43
5.3 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS	44
5.3.1 Teste de campo aberto (<i>open field</i>)	44

5.3.2 Labirinto aquático de Morris (<i>water maze</i>)	45
5.4 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	47
5.4.1 Quantificação da razão ventricular	47
5.4.2 Transferência de magnetização	48
5.5 AVALIAÇÕES HISTOQUÍMICAS	49
5.5.1 Coloração com hematoxilina e eosina	49
5.5.2 Histoquímica por solocromo cianina	52
5.6 AVALIAÇÕES POR IMUNOISTOQUÍMICA	54
5.6.1 Estudo imunoistoquímico para GFAP	54
5.6.2 Estudo imunoistoquímico para Ki-67	57
5.7 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	59
5.7.1 Dosagem dos antioxidantes totais presentes no plasma	59
5.7.2 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método <i>TBARS</i> no tecido cerebral	60
5.7.3 Dosagem da glutathione peroxidase no tecido cerebral	61
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	83

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1 Hidrocefalia

A hidrocefalia é uma condição neurológica complexa, em que ocorre o desequilíbrio na dinâmica do líquido cefalorraquidiano (LCR) provocando um distúrbio na produção, circulação e reabsorção do mesmo, o que pode levar a uma redução e/ou bloqueio do fluxo sanguíneo. Esse desequilíbrio entre a produção e absorção do LCR pode levar à dilatação ventricular, característica principal da hidrocefalia (MCALLISTER, 2012; DEL BIGIO; MCALLISTER, 1999).

No adulto normal, o volume de LCR circulante em torno do sistema nervoso central (SNC) é de 150 ml, no entanto, a quantidade total produzida por dia, cerca de 500 ml, é suficiente para substituir totalmente o volume circulante de três a quatro vezes (BRODBELT; STOODLEY, 2007). Na hidrocefalia, onde encontramos o fluxo liquórico alterado, e em meio às diversas áreas comprometidas, destacamos a dilatação ventricular como uma alteração que afeta várias estruturas do sistema nervoso central, assim como o corpo caloso, epêndima, parênquima cerebral, substância branca periventricular e o córtex. Essas afecções comprimem os hemisférios cerebrais contra a superfície interna do crânio podendo levar a uma ruptura do epitélio causando aumento na pressão intracraniana (PIC) (LOPES; MACHADO; LACHAT, 2003).

Os graus mais elevados de hidrocefalia e dilatação ventricular podem resultar em edema cerebral, conseqüentemente gerando uma redução do conteúdo de mielina, diminuindo os impulsos neuronais e suas sinapses nervosas. Em decorrência das lesões causadas pela ventriculomegalia ocorre também a astrogliose, que é caracterizada pela presença de astrócitos reativos que ingressam em substituição aos axônios e mielina lesionados no SNC (NORTON et al., 1992; SHOESMITH; BUIST; DEL BIGIO, 2000).

A hidrocefalia pode se manifestar decorrente de malformações do SNC, através de infecções, hemorragia intraventricular, traumatismos, tumores, cistos, estenose do aqueduto de Sylvius, ou pode estar associada a diversos efeitos congênitos como: espinha bífida, prematuridade e hereditariedade (CAVALCANTI; SALOMÃO, 2003).

Outro aspecto a ser destacado é que a hidrocefalia pode ser dividida em dois tipos: obstrutiva ou não comunicante que ocorre devido ao bloqueio da circulação liquórica, sendo

mais comum em crianças devido à anormalidade do aqueduto, lesão do 4º ventrículo, lesão ou mal formação da fossa posterior. E também na hidrocefalia do tipo não obstrutiva ou comunicante resultante à diminuição da absorção do líquido sobre a superfície do cérebro (WELCH, 1980; HASLAM, 2000).

Segundo um estudo recente realizado na Dinamarca, através de uma investigação realizada durante 30 anos, a prevalência da hidrocefalia infantil congênita varia entre um e 32 a cada 10.000 nascimentos (MUNCH et al., 2012). No Brasil, as incidências registradas no período de 1987 a 1998, pelo Estudo Colaborativo Latino Americano de Malformações Congênicas (ECLAMC), foram de 3,16 a cada 1.000 nascimentos (CAVALCANTI; SALOMÃO, 2003).

Atualmente o tratamento mais utilizado em pacientes hidrocefálicos é a cirurgia de derivação liquórica, no qual o líquido é retirado do interior dos ventrículos cerebrais para o meio externo, através da derivação ventricular externa (DVE), ou pode ser desviado do interior dos ventrículos cerebrais para outras cavidades corporais como: o átrio direito (derivação átrio-ventricular) ou, sendo mais comum na prática clínica, para o peritônio (derivação ventrículo-peritoneal), existem também outras cavidades que podem ser usadas para acomodar a derivação como a pleura (derivação ventrículo-pleural) ou o seio sagital superior (derivação ventrículo-sinusal) (DADLANI et al., 2015). Além das derivações citadas, há também a terceiroventriculostomia endoscópica, um procedimento geralmente rápido e seguro, que se mostra eficaz nos casos de hidrocefalia não comunicante, esta técnica pode evitar a implantação de uma válvula (PEREIRA et al., 2002).

O quadro clínico da hidrocefalia está relacionado à idade dos pacientes e à velocidade da manifestação dos sintomas. Em recém-nascidos e lactentes que ainda possuem fontanela aberta ocorre o aumento do perímetro encefálico, que pode ter seu fechamento adiado. Nessa fase, a medida do perímetro representa a avaliação clínica de maior importância no reconhecimento precoce da hidrocefalia. Em alguns casos, pode-se verificar o ‘olhar do sol poente’, determinado pela compressão do recesso pineal. Este fenômeno se refere ao deslocamento temporário ou permanente dos globos oculares para baixo, com a pálpebra superior fixa. Trata-se de um sinal precoce de hipertensão intracraniana, que surge, provavelmente devido à compressão do terceiro ventrículo dilatado sobre o nervo ocular comum. Em crianças maiores, adolescentes, adultos e idosos, os sintomas estão baseados na tríade da síndrome de hipertensão intracraniana, ou seja, cefaleia, vômitos e edema papilar, alterações da consciência, levando o paciente ao coma e até mesmo à morte (DRAKE, 2008; PRATES; ZANON-COLLANGE, 2005; STAUFFER, 1989).

1.1 Hidrocefalia experimental

Para a realização da hidrocefalia em animais utilizamos um mineral conhecido como caulim. Por ser um modelo simples e de fácil acesso, o caulim é comumente utilizado para fins de pesquisa por ter um elevado índice de sucesso para a produção do bloqueio liquórico, não necessitando de cirurgias e também pela técnica não alterar as estruturas anatômicas envolvidas (CATALÃO et al., 2014).

A hidrocefalia experimental induzida por caulim causa uma inflamação nas meninges dos animais, obstruindo as vias liquóricas, impedindo o fluxo de LCR nos hemisférios cerebrais, assim como acontece na hidrocefalia obstrutiva. No estágio agudo, ocorre um aumento da PIC, progressivo aumento dos ventrículos e consequentemente aumento do perímetro encefálico. Já no estágio crônico, a PIC se normaliza e a dilatação ventricular se estabiliza (DEL BIGIO et al., 1994; DEFEO et al., 1979; BRAUN et al., 1998).

1.2 Estresse oxidativo

Das lesões ocasionadas pela hidrocefalia percebemos a presença do estresse oxidativo, uma condição biológica onde há a formação de radicais livres, sendo estes radicais caracterizados como átomos ou moléculas altamente reativos que possuem elétrons não emparelhados em sua última camada, levando ao desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resultando em danos celulares (DREHER; JUNOD, 1996; JANSSEN et al., 2003).

O estresse oxidativo está presente na hidrocefalia devido à compressão e estiramento do parênquima cerebral levando a uma lesão tecidual, através da peroxidação lipídica, que possui efeito tóxico nas paredes dos vasos arteriais cerebrais, resultando em mudanças similares àquelas observadas no vasoespasma crônico. O cérebro é um dos locais mais afetados através do estresse oxidativo. Por ser um órgão rico em ácidos poliinsaturados há maior quantia de oxigênio sendo consumida, gerando consequentemente, elevadas taxas de radicais livres a partir de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) (FINKEL; HOLBROOK, 2000; HALLIWELL, 2000). Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas contendo oxigênio que podem ser geradas de forma endógena

durante o metabolismo celular normal, ou de forma exógena, quando o organismo é exposto a vários estímulos como exposição ao álcool, fumo, drogas, raios ultravioleta, entre outros (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Para se proteger das altas concentrações de EROs nosso organismo possui três mecanismos de defesas: mecanismo de prevenção das EROs, mecanismo de eliminação de EROs e mecanismo de reparo de moléculas. O mecanismo de prevenção das EROs impede a formação dos radicais livres ou espécies não radicais. O mecanismo de eliminação de EROs é formado por estruturas enzimáticas como catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) que podem ser adquiridos por outros meios através de respostas a estímulos como agressões por patógenos, fungos e insetos ou até mesmo a exposição a raios ultravioletas e não enzimáticos como tocoferóis e ácido ascórbico, ou polifenóis (provenientes da dieta), e o mecanismo de reparo de moléculas que foram modificadas por EROs que estabelece uma reconstituição de estruturas biológicas danificadas (SIES, 1993; RAMEL; WAGNER; ELMADFA, 2004).

O estresse oxidativo pode ser avaliado de acordo com a presença de radicais livres, produtos da liberação da peroxidação de lipídeos, proteínas e DNA, atividade ou quantidade de enzimas antioxidantes (FINAUD et al., 2006).

A glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima de extrema importância no sistema de defesa antioxidante que tem a função de catalisar a redução de hidroperóxidos, incluindo peróxido de hidrogênio e proteger a célula dos danos oxidativos. Com a exceção de fosfolípido-hidroperóxido GPx, um monômero, todas as enzimas GPx são tetrâmeros de quatro subunidades idênticas. Cada subunidade contém uma selenocisteína no sítio ativo que participa diretamente na redução de dois elétrons do substrato peróxido. A enzima utiliza glutathione como o doador de elétrons final para regenerar a forma reduzida da selenocisteína (URSINI; MAIORINO; GREGOLIN, 1985; FORSTROM; ZAKOWSKI; TAPPEL, 1978).

Malondialdeído (MDA) é um produto natural de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é um mecanismo bem estabelecido de lesão celular em plantas e animais e é utilizado como um indicador do estresse oxidativo nas células e tecidos. Peróxidos lipídicos, derivados de ácidos poliinsaturados, são instáveis e decompõe-se para formar uma série complexa de compostos que incluem compostos carbonilo reativos, tais como MDA.

A medição de ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um método bem estabelecido para dosagem e monitorização da peroxidação lipídica. Mesmo que ainda há uma controvérsia na literatura quanto à especificidade de TBARS em direção a outros compostos de MDA, ele ainda continua a ser o mais utilizado para determinar a peroxidação lipídica. Os lipídios com

maior insaturação irão dar lugar a valores mais elevados de TBARS (YAGI, 1998; ARMSTRONG; BROWNE, 1994).

1.3 Neuroproteção e Resveratrol

Neuroproteção constitui em proteção dos efeitos celulares no tecido cerebral, nem sempre farmacológico, mas que podem atuar diretamente nos neurônios por eles se apresentarem mais susceptíveis à lesão isquêmica. As estratégias mais importantes na neuroproteção incluem medidas que aumentem o suprimento sanguíneo para o tecido, a viabilidade da célula diante da circulação diminuída e também contribuam para a manutenção de normoxia, pressão de perfusão cerebral adequada, manutenção da hipotermia leve, e redução do aumento da PIC (DOYLE; MATTA, 1999).

Quanto à indicação do tratamento cirúrgico, os neurocirurgiões vivenciam um dilema ao debater os benefícios do tratamento com derivações liquóricas juntamente com os riscos que a mesma oferece além de definirem qual o melhor momento para a realização do procedimento, e o quanto é seguro para o paciente adiar um tratamento sem qualquer outro tipo de intervenção para aqueles que ainda apresentam dilatação ventricular discreta ou que apresentam um impedimento clínico para a cirurgia imediata (infecção grave de pele, instabilidade hemodinâmica, etc.). Deste modo, pensando nestas intercorrências, pesquisas estão sendo desenvolvidas a fim de proteger o tecido nervoso, melhorando a oferta de oxigênio aos tecidos no período de espera, mesmo que haja a indicação definitiva no futuro para a colocação do shunt. Estas intervenções neuroprotetoras podem ainda ser úteis na aceleração da recuperação do tecido nervoso após a instituição do tratamento cirúrgico (CATALÃO et al., 2014).

O Resveratrol (3, 4', 5-trihidroxi-trans-estilbeno) é um polifenol encontrado em mais de 70 espécies de plantas com atividades que incluem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais. É uma substância que tem mostrado um efeito promissor em diversas doenças, incluindo as do SNC (ATES et al., 2007).

Na década de 1970 começaram as pesquisas a fim de identificar o conteúdo presente nas cascas das uvas que as tornariam benéficas a vários tecidos do organismo (LANGCAKE; PRYCE, 1976). Em 1992 surgiu o primeiro estudo relacionado aos efeitos das propriedades do Resveratrol no vinho (SIEMANN; CREASY, 1992).

A partir desta descoberta, inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos a fim de esclarecer quais são os efeitos benéficos desta substância e seu mecanismo de ação. Sua síntese ocorre quase que exclusivamente nas cascas das uvas, onde é formado pela condensação de três moléculas de malonil-CoA e uma de 4-coumaroil-CoA (KING; BOMSER; MIN, 2006). Os níveis de Resveratrol variam de acordo com a composição do solo, exposição ao sol, infecção por fungos, além do processo de fabricação e conservação dos vinhos e sucos de uva (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997). Nos vinhos brancos a quantidade de compostos fenólicos encontrados é cinco vezes menor, quando comparado ao vinho tinto (WATERHOUSE, 2002). O Resveratrol também pode ser encontrado no amendoim (*Arachis hypogaea*, *Fabaceae*) (CHUKWUMAH et. al., 2009), no eucalipto (*Eucalyptus wandoo*, *Myrtaceae*) (HATHWAY; SEAKINS, 1959), na raiz da *Ko-jo-kon* (*Polygonum cuspidatum*) (DU et al., 2007), entre vários outros.

Estudos realizados na França e dados apresentados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) mostraram que apesar do alto consumo de gorduras saturadas, altos índices de sedentarismo e tabagismo, a incidência de aterosclerose e doenças coronarianas é menor do que quando comparados com outros países, fato atribuído ao alto consumo de vinho. A partir desses estudos em que se comprovaram seus benefícios à saúde humana, deu início ao paradoxo Francês, o que levou vários cientistas a pesquisar mais o vinho e seus compostos (FUHRMAN et al., 2005; SOUZA et al., 2006).

O Resveratrol é vendido comercialmente na China como suplemento dietético. No Japão é utilizado no preparo de chás, como o Itadori que representa a fonte não alcoólica de resveratrol. E no Brasil pode ser encontrado em farmácias de manipulação, lojas de suplementos e de produtos naturais, onde é vendido como suplemento alimentar e antirrugas com potente ação antioxidante (DELMAS, JANNIN, LATRUFFE, 2005).

O sistema cardiovascular tem sido alvo de inúmeras pesquisas na busca de drogas e compostos protetores. Foi comprovado que o Resveratrol é capaz de inibir a agregação plaquetária tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BERTELLI et al., 1995), além disso, foi citado como um forte agente antitumoral, bloqueando o processo carcinogênico nos estágios de iniciação, promoção e progressão da doença (JANG et al., 1997). Quando adicionado à dieta de roedores, o Resveratrol impediu o desenvolvimento de câncer em várias regiões, incluindo pele, próstata, pâncreas, mama, e porção terminal do trato digestório (BISHAYEE, 2009; VANG et al., 2011).

Outros aspectos que podemos mencionar são sua eficácia no combate à infertilidade associada à idade, suas propriedades osteogênicas e osteoindutivas que previnem a perda

óssea da pós-menopausa, várias formas de artrite, doença óssea metabólica, e também como um agente neuroprotetor potente voltado para o tratamento experimental de isquemia focal, reduzindo a área de infarto cerebral (HUANG et al., 2001; LIU et al., 2013; MOBASHERI; SHAKIBAEI, 2013). Estudos com lesões da medula espinhal (YANG; PIAO, 2003; KIZILTEPE et al., 2004; KAPLAN et al., 2005; ATEŞ et al., 2007) de epilepsia (GUPTA; CHAUDHARY; SRIVASTAVA, 2002; WU et al., 2009), e na doença de Huntington, utilizando o Resveratrol mostraram que houve redução das sequelas neuropatológicas e comportamentais (PARKER et al., 2005), mais uma vez, exibindo sua ação benéfica ao SNC.

De acordo com trabalhos publicados em animais, a quantidade necessária de Resveratrol diária para receber todos os seus benefícios é de aproximadamente 20 mg/kg (BOSCOLO, et al., 2003). Sua maior concentração é encontrada na uva onde se apresenta com uma variação de 50-100 µg/g (JEANDET et al., 2012), no vinho a quantidade de Resveratrol varia entre 1.5-3 mg/L (ROMERO et al., 1996), no suco de uva a variação do composto é de 3-15 µg/L, podendo variar conforme a espécie da uva (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997) e na raiz da *Polygonum Cuspidatum*, a média de conteúdo de Resveratrol é de cerca de 1-3 mg/g (ZHANG, et al., 2006).

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Nem todos os pacientes com hidrocefalia podem ser submetidos ao tratamento cirúrgico com derivações liquóricas imediatamente após o diagnóstico, seja por apresentarem condições clínicas desfavoráveis ou por apresentarem ainda dilatação ventricular inicial. Na tentativa de redução dos danos teciduais até o tratamento definitivo, ou mesmo para reforçar a recuperação completa após a instalação de um *shunt*, drogas neuroprotetoras vêm sendo testadas. Devido ao reconhecido poder antioxidante do Resveratrol em diversas doenças, justifica-se ser testado como droga neuroprotetora na hidrocefalia.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor do Resveratrol na hidrocefalia experimental em ratos Wistar jovens através de:

- Testes comportamentais de campo aberto (*open field*) e labirinto aquático de Morris (*water maze*).
- Análise da mielinização e maturação do encéfalo por transferência de magnetização (MTR) através da ressonância magnética.
- Avaliação histológica para análise da citoarquitetura geral (hematoxilina e eosina), medida do corpo caloso e análise do processo de mielinização (solocromo cianina).
- Imunoistoquímica para quantificar astrócitos reativos (GFAP) e análise das células em divisão mitótica (Ki-67).
- Análises bioquímicas para medir a capacidade total de antioxidantes presentes no plasma (antioxidantes totais), dosagem da glutathione peroxidase presente no tecido encefálico (glutathione peroxidase) e dosagem do malondialdeído para medir a peroxidação lipídica (TBARS).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos envolvendo os animais estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo nº129/2012 e aprovados pelo comitê local realizado pela comissão de ética em experimentação animal (CETEA – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP). Todos os esforços foram feitos a fim de minimizar o sofrimento e a quantidade de animais usados nesta pesquisa.

Foram utilizadas ninhadas de ratos machos da linhagem Wistar, com sete dias de vida, oriundas do Serviço de Biotério da Prefeitura do Campus Administrativo de Ribeirão Preto, em número suficiente para composição dos grupos experimentais. Cada ninhada foi constituída pela rata-mãe e 8 a 10 filhotes, transportados em uma única caixa alojamento, no dia do nascimento, para o Biotério da Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Durante a permanência dos animais no Biotério, os mesmos receberam água e dieta padrão de laboratório para roedores às mães *ad libitum*. Os filhotes em fase de desmame também tiveram acesso à dieta e à água.

4.1 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 Isoflurano ou mantidos sem intervenção para utilização como controle normal. Para indução da hidrocefalia cada animal foi posicionado por um auxiliar, que segurava a cabeça com uma mão e o corpo com a outra mão, flexionando o pescoço do animal, deixando livre a região cervical dorsal. Através da palpação, foi identificado o espaço entre a margem posterior do forame magno, no osso occipital, e a borda cranial do arco dorsal da primeira vértebra cervical (figura 1). Com uma agulha odontológica Mise 0,3, de bisel curto, foi realizada uma punção suboccipital, e injetado, por injeção percutânea lenta, 0,04ml de uma suspensão de caulim (Merck®) a 15% em água destilada, esterilizada em autoclave. A seguir, os animais foram recolocados em sua caixa alojamento de origem, retornando ao Biotério.

Figura 1 - A: Indução da hidrocefalia. Auxiliar posiciona o rato e o pesquisador realiza a punção percutânea na cisterna magna com injeção de caulim (Merck®); B: Rato hidrocefálico em P14 (21 dias de vida).

4.2 Composição dos grupos experimentais

- Grupo Controle (C): Os animais foram sacrificados 14 dias após a injeção de caulim (21 dias de vida) (n=10).
- Grupo Hidrocefálico não tratado (HNT): Os animais foram sacrificados 14 dias após a injeção de caulim (21 dias de vida) (n=20).
- Grupo Hidrocefálico Tratado (HTR): foi administrada diariamente injeção intraperitoneal de Resveratrol (20mg/kg) a partir do primeiro dia pós- indução da hidrocefalia. Esses animais que receberam a droga também foram sacrificados com 14 dias após a injeção de caulim (21 dias de vida) (n=20).

Os animais foram analisados quanto a possíveis alterações clínicas (perda de peso e desidratação, alterações da marcha e da consciência, negligência com a higiene). Quando eram constatados sofrimento e lesão neurológica grave, perda de peso importante ou desidratação que não respondia a hidratação com injeção subcutânea com soro fisiológico era realizado o sacrifício com dose excessiva de anestésico, não sendo usado para o experimento.

Após a injeção de caulim e tratamento (21 dias de vida), o material foi coletado para análise bioquímica (n=10) e para análise histológica (n=10). Observação: os encéfalos usados

para análise bioquímica não foram usados para análise histológica, pois precisaram ser homogeneizados (triturados) para processamento.

4.3 Administração do Resveratrol

O Resveratrol foi adquirido na farmácia de manipulação Liane, na cidade de Ribeirão Preto, sob a forma de pó acondicionado em cápsula (98%), e foi obtido especificamente na raiz da *Polygonum cuspidatum*, procedente da China e com peso molecular de 228,34. O extrato foi fracionado em porções de 0,002 mg e armazenado em eppendorfs de 1,5 ml. As soluções foram preparadas diariamente da seguinte forma: 0,002 mg de Resveratrol, 0,7 ml de água e 0,3 ml de álcool 50%. Logo após o preparo, e antes da aplicação, a solução era colocada em vórtex QL- 901 (Biomixer) para homogeneizar. A diluição ocorria apenas no momento da administração da injeção, e descartado o que não era utilizado.

4.4 Estudos comportamentais

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

Para estudo do desenvolvimento sensoriomotor, o comportamento deambulatório foi avaliado pelo teste de campo aberto “*Open Field*” a cada dois dias, a partir do sexto dia após a aplicação da injeção de caulim. Cada animal foi observado individualmente em uma arena de acrílico transparente de 60 cm de comprimento e 45 cm de altura, por 2 minutos, sendo avaliados, cuidados com a higiene, exploração do ambiente e marcha, de acordo com a escala: 4 = alerta, com exploração e marcha normal; 3 = discretamente letárgico, com atividade reduzida, mas com marcha normal quando estimulado; 2 = cifótico, caminha, mas a marcha tem base alargada, instável ou atáxica; 1 = mal consegue andar, mas ainda se alimenta; 0 = próximo da morte ou eutanasiado. Para a realização deste teste, foram utilizados cronômetros a partir do início dos movimentos. As arenas foram limpas com solução de sabão neutro entre as observações de diferentes ninhadas de animais.

Para o estudo da memória e aprendizagem espacial, os ratos foram submetidos ao teste com labirinto Aquático de Morris modificado (*water maze*). O aparelho é composto por uma piscina circular (100 cm de diâmetro, 50 cm de altura) e uma plataforma transparente (34 cm de altura, 8 cm de diâmetro) posicionada 2 cm abaixo da superfície da água. A temperatura da água da piscina foi controlada em aproximadamente 22°C.

O teste foi dividido em duas fases (fase de adaptação e treinamento e fase de aprendizagem espacial). A fase de adaptação e treinamento foi realizada no dia correspondente ao 9º dia pós-indução da hidrocefalia (P09), no qual os ratos tinham 60 segundos livres para nadar na piscina, sem a plataforma. A seguir, a plataforma era introduzida no tanque, posicionada em um quadrante (o tanque foi dividido aleatoriamente em 4 quadrantes). O treinamento foi realizado em quatro séries, sendo que em cada uma o animal era colocado na água voltado para um dos 4 pontos cardeais (norte, sul, leste e oeste). Esse cuidado era feito para que o rato memorizasse a parede iluminada como ponto de referência para localizar a plataforma camuflada sob a superfície aquática, e não o encontro ao acaso da mesma pela natação em linha reta. A sala que abriga o tanque permaneceu totalmente escura, exceto por uma pequena fonte luminosa fixada próxima a um dos lados externos do tanque (norte), para que o animal identificasse o ponto de referência a ser memorizado. O teste foi, então, aplicado nos dias P10 e P11 pós-indução, com o animal sendo posicionado em cada sessão, voltado para um dos pontos cardeais (com 4 sessões sequenciais), em 2 turnos em um mesmo dia (manhã e tarde). O tempo limite para o animal alcançar a plataforma e ser considerado um acerto foi de 60 segundos. No final de cada sessão o animal era colocado na plataforma para descanso de 15 segundos, após era recolocado junto à parede da piscina, para iniciar uma nova sessão. Foi cronometrado o tempo gasto do ponto de partida até o encontro da plataforma de descanso. O tempo médio de cada turno diário foi calculado pela média do tempo gasto para o encontro da plataforma em cada uma das 4 sessões. Se o animal não encontrasse a plataforma até um tempo limite de 60 segundos seria colocado na plataforma para descanso de 30 segundos, e o tempo considerado para execução da tarefa naquela sessão seria de 60 segundos. No final do teste, os animais foram secados com uma toalha macia e mantidos em uma caixa aquecida, e então, recolocados junto com a mãe e os outros filhotes da ninhada. Entre cada animal examinado foi recolhida toda sujeira da piscina (dejetos animais sólidos e partículas da cama de maravalha) visíveis na água.

4.5 Estudos por ressonância magnética

Os animais com hidrocefalia e seus controles, no 13º dia pós-indução, foram encaminhados para aquisição de imagens por ressonância magnética (RM) do encéfalo, sob anestesia com quetamina 10% e xilasina 10% intraperitoneal (nas doses de 0,1 e 0,05 mg/100g de peso corporal).

A aquisição de RM foi realizada em um *scanner* 3T (Philips, Achieva) usando uma bobina indicada somente para pequenos roedores. O protocolo incluiu uma imagem 3D ponderada em T2 e duas sequências de MTR/3D quase idênticas (figura 2). A sequência T2 A- 3D ponderada foi escolhida para aumentar o contraste entre o fluido cerebrospinal e tecido cerebral, com alta resolução espacial. Usamos a transferência de magnetização pré-pulso definido como padrão no scanner MR Philips (composto de 121 pulsos de RF com 90º e 4 elementos retangulares com uma duração de 275 mS cada). A partir de ambas as imagens, o valor MTR em cada pixel foi calculado usando a seguinte expressão: $MTR [\%] = (PIwoMT - PIwMT) \cdot 100 / PIwoMT$; onde, PIwMT e PIwoMT representam a intensidade dos pixels na imagem com a transferência de magnetização pré-pulso.

A RM foi utilizada para quantificação da mielina, através da transferência de magnetização, calculada no encéfalo no corte coronal médio e em amostras da região subcortical dorsal e ventral ao ventrículo lateral nos cortes: coronal anterior (1º corte atrás das órbitas), coronal médio e coronal posterior (nível do mesencéfalo cranial).

O protocolo de RM utilizado para a aquisição das imagens foi constituído pelas sequências obtidas por transferência de magnetização (3D MTR) e em T2 (3D T2), de acordo com os parâmetros abaixo (figura 2):

Sequências	3D T2	3D MTR
Tempo do echo	60ms	11ms
Tempo de repetição	1500ms	23ms
Plano	Sagital	Sagital
Dimensões do voxel	0.3mm x 0.3mm x 0.3mm	0.3mm x 0.3mm x 0.3mm
Espessura	0.3mm	0.3mm

Figura 2 - Parâmetros detalhados do protocolo para aquisição das imagens de RM, nas sequências ponderadas de T2 e MTR.

A segmentação manual dos ventrículos laterais e total do cérebro foi realizada no plano coronal em imagem 3D- T2W usando o *STARTX software for Linux CYGWIN 4.1.10 version*. A razão ventricular (RV) foi calculada dividindo-se a área dos ventrículos laterais pela a área total do cérebro, como se segue:

$RV = AVL/AVL+AC$, onde:

AVL = área do ventrículo lateral (colorido em vermelho, na figura 3)

AC = área do cérebro (colorido em verde, na figura 3)

O MTR foi também obtido no plano coronal médio (nível do quiasma óptico) usando-se a imagem do encéfalo total gerado na segmentação e o mapa MTR. Os dados de transferência de magnetização foram obtidos através de demarcações de áreas de interesse (ROI), uma na região dorsal e a outra na região ventral ao ventrículo lateral (figura 3).

Figura 3 - Imagem obtida por RM, sequência em T2, em reconstrução coronal média, com delimitação das áreas de interesse (ROI) (Azul: ROI dorsal ao ventrículo lateral / Violeta: ROI ventral ao ventrículo lateral) utilizadas para quantificação da mielina e delimitação das áreas do encéfalo e, ventrículos laterais, para cálculo da razão ventricular (Área vermelha: ventrículo lateral / Área verde: parênquima encefálico).

4.6 Coleta das amostras: Perfusão cerebral e dissecação de estruturas

Ao final dos tempos experimentais, os animais de cada grupo foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de quetamina 10% e xilasina 10% (nas doses de 0,1 e 0,05 mg/100g de peso corporal). Após posicionamento na mesa cirúrgica, em decúbito dorsal, foi realizada uma ampla incisão em “Y” em cada animal, no tórax, das duas clavículas até o apêndice xifóide, e, no abdome, incisão mediana xifo-púbica.

Nos animais selecionados para análise histológica e imunoistoquímica (metade de cada grupo), uma agulha hipodérmica 25 x 0.8mm (21G x 1) foi introduzida na ponta do ventrículo esquerdo e canulada até a raiz da aorta, sendo iniciada a perfusão transcardíaca com solução salina, após uma pequena incisão na aurícula direita, até o clareamento do líquido de saída (cerca de 1 ml/g de peso do animal), com auxílio de uma bomba de perfusão peristáltica (Fisher Scientific). A seguir, os animais foram decapitados e seus encéfalos retirados em bloco, através de uma craniectomia de vértex, subdividido no plano coronal, em uma porção anterior e outra posterior, tomando-se como referencial o quiasma óptico, depois imersos 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 7 dias à mesma temperatura. Nos animais selecionados para análise bioquímica (metade de cada grupo), foi puncionada a ponta do ventrículo cardíaco esquerdo com uma agulha 21G, introduzindo-se a mesma até a raiz da aorta, assim aspirou-se 2 ml de sangue total e armazenou-se em um frasco tipo vacutainer® com heparina, para a dosagem de antioxidantes presentes no plasma e em seguida iniciou-se a perfusão cardíaca. Seus encéfalos foram retirados, divididos no plano sagital e congelados em nitrogênio líquido, mantidos em freezer -80°C para posteriores dosagens de antioxidantes totais, glutationala-peroxidase e malondialdeído.

4.7 Análises Histoquímica e Imunoistoquímica

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

Para análise por histoquímica, as lâminas foram mantidas em estufa (60°C), por uma hora, para derretimento da parafina. A seguir, os cortes foram submetidos ao processo de desparafinização, seguidos de banhos sequenciais de xilol, álcool em concentrações decrescentes e água; posteriormente, foram corados com hematoxilina e eosina ou solocromo-cianina (cada amostra foi corada com ambas as colorações). Foi observada (hematoxilina e eosina) a citoarquitetura geral, distribuição das estruturas e densidade celular. Já com solocromo-cianina, o grau de mielinização da substância branca periventricular.

Para imunoistoquímica, as lâminas foram mantidas em estufa a 60°C, por 30 minutos, e desparafinizadas em banhos sequenciais de xilol e álcool. Foram realizados estudos por imunoistoquímica para GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), para avaliação da distribuição e aspecto morfológico da astróglia, e Ki-67 para avaliação da matriz germinativa no ângulo externo do ventrículo lateral. Após a recuperação antigênica, quando indicado, pelo método de acidificação e aquecimento (citrato de sódio em micro-ondas), foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% em metanol. Posteriormente, foi feito o bloqueio com soro adequado a 10% em PBS, por 30 minutos em câmara úmida. Logo após, os cortes foram incubados “*overnight*” à temperatura de 4°C com

o anticorpo primário anti-GFAP (DAKO Z0334, Dinamarca), em diluições apropriadas, previamente testadas (1:3000) ou anti-Ki-67 (Santa Cruz sc- 23900) com diluição de 1:40. Retirado o anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado (anticorpo biotilado de cabra anti-coelho - Santa Cruz Biotechnology SC-2040 ou anti-camundongo - Santa Cruz Biotechnology SC-2039) diluído 1:300 em BSA. Após, foram incubados com o anticorpo terciário estreptavidina conjugada com HRP (BioLegend cat.405210) diluído 1:400 em PBS. A seguir, foram revelados com DAB (3,3'- diaminobenzidina - Sigma). Por fim, as lâminas foram submetidas à 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 *Permout®*. Observação: para a imunoistoquímica, os cortes foram estendidos em lâminas histológicas silanizadas.

4.8 Análise Bioquímica

As amostras de tecido encefálico previamente congeladas foram homogeneizadas com um homogenizador de tecidos (*Polytron – Kinematica PT 1600E*). As amostras de sangue, após a formação do coágulo, foram centrifugadas a 2.000 x g por 4°C por 15 min, para separação do plasma, que foi estocado a -80°C. Todas as amostras assim obtidas (plasma e tecido) foram submetidas aos testes bioquímicos com uso de kits, seguindo a orientação do fabricante (Cayman).

O ensaio “*Antioxidant Assay Kit*” (n°709001) foi realizado para medir a capacidade total de antioxidantes presentes no plasma. As amostras de plasma previamente armazenadas foram descongeladas e diluídas 1:20 com o tampão apropriado (kit). A seguir foram distribuídas, em duplicatas, nos poços da placa, ao lado das diluições do padrão. Após, houve a pipetagem dos outros reagentes do kit e aguardou-se as reações químicas. Para a leitura da placa, com os padrões e as amostras foi, utilizada uma leitora com medida de absorbância de 750 nm.

Para dosagem do malondialdeído (MDA) (para medir a peroxidação lipídica) foi utilizado o “*TBARS Assay Kit*” (n°1009055). O tecido cerebral previamente homogeneizado foi descongelado e centrifugado a 1.600 x g por 10 min a 4°C. As amostras (sobrenadantes) e as diluições do padrão foram distribuídas em duplicatas em uma placa de 96 poços e

acrescentadas os demais reagentes do kit. Após o tempo de pausa para as reações químicas, a placa foi lida em leitora com absorvância de 530-540 nm conforme orientações do fabricante.

Para a dosagem da Glutathione Peroxidase, presente no tecido cerebral, foi usado o “*Glutathione Peroxidase Assay Kit (GPx)*” (n°703102). As amostras previamente descongeladas foram centrifugadas a 10.000 x g por 4°C por 15 min. As diluições da solução-padrão e das amostras foram distribuídas em triplicatas nos poços da placa de leitura. Os reagentes adicionais do kit foram então pipetados. A atividade do Gpx foi calculada a partir da diferença por minuto e a leitura da placa na leitora foi realizada com uma medida de absorvância de 340 nm conforme orientações do fabricante.

4.9 Documentação fotográfica

Para documentação fotográfica das lâminas e contagem de células (GFAP e Ki-67) utilizamos o microscópio Nikon Eclipse E 200 MV com sistema de captura de imagens digitais (MOTICAN 10), com software dedicado em ambiente Windows MOTIC images plus 2.0, adquirido com parte dos recursos FAPESP e instalado no nosso laboratório do grupo de pesquisa.

No momento de fotografar foi realizado um retângulo com área reconhecida e assim foram contadas as células marcadas (GFAP e Ki-67), já para solocromo cianina foi colocada uma linha de uma extremidade à outra para medir a espessura do corpo caloso.

Para as lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram fotografadas a região do corpo caloso, matriz germinativa, cápsula externa e núcleos da base em objetiva de 10X. Na comparação entre o grupo controle e hidrocefálico foram fotografadas na região lateral à linha média em objetiva de 4X.

As lâminas coradas com solocromo-cianina foram fotografadas a região do corpo caloso (objetiva de 20X) e realizada a medição da sua espessura. Nessas lâminas também foi aplicado um escore de 0 a 2 para avaliação da mielinização, sendo 0: tonalidade fraca em azul, 1: tonalidade média em azul e 2: tonalidade forte.

Nas lâminas imunomarcadas com GFAP foram fotografadas as regiões do corpo caloso e da matriz germinativa (objetiva de 40X), onde foi realizada a contagem dos astrócitos reativos e para classificação da reação astrogliar, foi aplicado um escore de 0 a 2, sendo 0:

ausência de astrócitos reativos, 1: astrócitos reativos com prolongamentos finos e delicados e 2: astrócitos reativos com prolongamentos grossos.

Já as lâminas imunomarcadas com Ki-67 foram fotografadas (objetiva de 40X) apenas na região da matriz germinativa no ângulo externo do ventrículo lateral (área de intensa proliferação celular), onde foi realizada a contagem das células marcadas em divisão mitótica.

4.10 Análises estatísticas

Foi utilizado o programa GraphPadPrismversion 5.0 (GraphPad Software, Inc. 2007). Quando apropriado, dados paramétricos foram utilizados para comparações de grupos com dados normalmente distribuídos (análise de variância - ANOVA, seguido pelo pós-teste de *Tukey*), enquanto dados não-paramétricos (*Kruskall-Wallis*, seguido pelo pós teste de *Dunn*) foram usados para outras comparações. As diferenças estatísticas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do peso corporal

Para análise do peso corporal dos três grupos estudados realizamos dois tipos de comparações: ganho ponderal diário e porcentagem de peso na primeira e segunda metade do experimento (P0 ao P7 e P7 ao P14) e global (P0 ao P14).

O peso inicial antes da indução da hidrocefalia (P0) era semelhante nos três grupos estudados, apesar dos ratos HNT exibirem peso ligeiramente maior que os outros dois grupos (C: $x = 14,47g \pm 1,23$; HNT: $x = 16,47g \pm 1,01$; HTR: $x = 14,90g \pm 0,56$).

No P1, os animais do grupo HTR apresentaram uma perda de peso, enquanto os ratos dos outros dois grupos tiveram ganho ponderal. Entretanto, a média de peso aferida neste dia foi significativamente diferente entre HNT e HTR, com HNT com maior peso que HTR ($p < 0,05$) (C: $x = 16,81 \pm 1,57$; HNT: $x = 16,97 \pm 0,95$; HTR: $x = 14,23 \pm 0,40$). Entre P2 e P9, os grupos C e HNT exibiram maior média de peso corporal que o grupo HTR. Nos dias P10 e P11, foram observadas apenas diferenças significativas entre os grupos hidrocefálicos, onde os ratos HNT apresentavam maior ganho de peso do que os animais do grupo HTR ($p < 0,01$). Já do P12 ao P14, os ratos do grupo HTR apresentaram menor peso corporal tanto em relação aos animais do grupo HNT quanto do grupo C.

O grupo HNT e C apresentaram ganhos semelhantes de peso durante os 14 dias de experimento.

Gráfico 1 - Média de pesos diários dos três grupos experimentais. O peso inicial foi semelhante nos três grupos estudados. No P1, os animais do grupo HTR apresentaram perda de peso, enquanto os ratos dos outros dois grupos tiveram ganho ponderal. O grupo HNT e C apresentaram ganhos semelhantes durante os 14 dias de experimento, apresentando diferenças significativas quando comparados com o grupo tratado com Resveratrol.

Na análise do ganho percentual de peso em relação ao dia pré-indução da hidrocefalia (P0), na primeira metade do experimento observamos que os ratos C ganharam mais peso que os ratos HNT ($p < 0,05$) e HTR ($p < 0,01$), e entre os ratos hidrocefálicos, os animais HNT ganharam mais peso que os HTR ($p < 0,01$) (C: $x = 108,20\% \pm 8,31$; HNT: $x = 80,79\% \pm 3,38$; HTR: $x = 46,77\% \pm 5,69$).

Entretanto, na segunda metade do tempo experimental (peso de P14 em relação ao peso de P7), houve uma desaceleração do ganho de peso dos ratos C, enquanto que os hidrocefálicos passaram a ganhar mais peso que os ratos sem hidrocefalia, porém sem diferença significativa (C: $x = 58,59\% \pm 2,64$; HNT: $x = 61,84\% \pm 2,55$; HTR: $x = 71,52\% \pm 3,69$) (gráfico 2).

Gráfico 2 - Variação de peso ao longo do experimento. A: P0 ao P7: grupo controle apresentou maior ganho de peso quando comparado com os grupos HNT ($p < 0,05$) e HTR ($p < 0,01$). O grupo HNT ganhou mais peso que o grupo HTR ($p < 0,01$). B: P7 ao P14: apesar da desaceleração do ganho de peso dos animais C, e aumento de peso dos animais HTR, não houve diferença estatística. C: P0 ao P14: houve diferença significativa entre o grupo C e HTR, e entre o grupo C e HNT ($p < 0,01$).

5.2 Avaliação comportamental geral

Durante todo o período avaliado, o comportamento dos animais do grupo HTR era semelhante aos animais do grupo C: os animais apresentavam-se ativos e atentos, movimentando-se com rapidez (exploração horizontal), tendiam a subir nas laterais da caixa-alojamento (exploração vertical) e demonstravam comportamentos naturais com mais frequência como luta e limpeza corporal. Também apresentavam um padrão de marcha normal, ou seja, andavam com as quatro patas apoiadas no chão.

Já os animais do grupo HNT eram menos ativos e atentos, com exploração horizontal e vertical reduzida, com menor interação com os companheiros de ninhada e descuido com a higiene corporal. O padrão de apoio da marcha era anormal, com tendência a andar nas pontas dos pés, base de apoio alargada e presença de cifose torácica.

5.3 Avaliações comportamentais

5.3.1 Teste de campo aberto (*open field*)

No teste de *open field* foi observado que em P6, P8 e P10, apesar dos animais dos grupos C e HTR exibirem melhor desempenho e consequentemente receberem melhores notas no escore que os ratos do grupo HNT, os três grupos estudados não apresentaram diferenças estatísticas no teste.

Em P12 os animais do grupo C apresentavam desempenho melhor que aqueles do grupo HNT ($p < 0,05$), sendo que nesse dia de teste, os animais do grupo C já alcançavam o escore máximo conferido (C: Md= $4,00 \pm 0,00$; HNT: Md= $2,80 \pm 0,29$; HTR: Md= $3,69 \pm 0,13$). Entre os grupos C e HTR, e entre os grupos HNT e HTR, não foram observadas diferenças nesse dia de teste.

Por outro lado, em P14, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os animais do grupo HNT e HTR ($p < 0,05$) (HNT: Md= $3,40 \pm 0,16$; HTR: Md= $4,00 \pm 0,00$), mostrando que os animais do grupo HTR tinham mais desempenho.

Gráfico 3 - Desempenho dos animais no teste de *Open Field*. A: em P06 os animais C e HTR estavam semelhantes. B: em P10 os animais do grupo HNT demoraram mais para alcançar a plataforma quando comparados com os outros dois grupos. C: em P12 os grupos C e HNT apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). D: em P14 houve diferença estatística entre o grupo HTR com o grupo HNT ($p < 0,05$), já o grupo C e HTR estavam semelhantes.

5.3.2 Labirinto aquático de Morris (*water maze*)

No primeiro dia de teste (P10), realizado no período da manhã, os animais encontravam a plataforma aproximadamente no mesmo tempo, entretanto no mesmo dia no período da tarde os animais do grupo HTR tinham uma tendência a encurtar o tempo para encontrar a plataforma em relação aos outros animais, porém, sem apresentar diferença significativa entre eles.

Já no segundo dia de teste (P11), no período da manhã, os animais C e HTR encontravam a plataforma mais rápido que os animais HNT, entretanto as diferenças só foram significativas entre os grupos C e HNT ($p < 0.05$) (C: $x = 34,25 \pm 5,54$; HNT: $x = 51,60 \pm 1,88$; HTR: $x = 41,50 \pm 4,19$). No mesmo dia, no período da tarde, essa tendência se manteve, porém sem diferenças estatísticas.

Gráfico 4 - Média dos tempos obtidos no teste *water maze*. A: em P10, no período da manhã, os animais do grupo C se mostraram mais rápidos para alcançar a plataforma quando comparados com os outros dois grupos, porém sem diferença significativa. B: em P10, no período da tarde, os animais do grupo HTR mostraram um desempenho melhor, porém sem diferença significativa. C: em P11, durante o período da manhã, houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre os grupos C e HNT. D: no teste em P11, no período da tarde, os animais HNT, apesar da melhora, ainda estavam com dificuldade para alcançar a plataforma quando comparados com os outros grupos.

Gráfico 5 - Desempenho dos animais C, HNT e HTR no teste de *water maze*. Observa-se que os animais controles passaram a levar menos tempo para atingir a plataforma no segundo dia de teste, enquanto que os animais tratados com Resveratrol já demonstravam ter aprendido onde estava a plataforma. Por outro lado, os animais não tratados levaram muito mais tempo para aprender o mesmo e ainda apresentavam um tempo maior para achar a plataforma. O tempo para atingir a plataforma começou a reduzir discretamente no segundo teste do segundo dia.

5.4 Ressonância magnética

5.4.1 Quantificação da razão ventricular

A razão ventricular (RV) entre os animais dos grupos HNT e HTR foi semelhante, ou seja, a dilatação ventricular foi similar nos dois grupos hidrocefálicos (HNT: $x = 0,5502 \pm 0,0583$; HTR: $x = 0,4497 \pm 0,0440$), porém, quando comparados os grupos hidrocefálicos com o grupo controle (C: $x = 0,0031 \pm 0,0008$; HNT: $x = 0,5502 \pm 0,0583$), a RV era muito menor nos ratos sem hidrocefalia ($p < 0,01$) (gráfico 6).

Gráfico 6 - Semelhança da razão ventricular entre os grupos HNT e HTR. Diferença estatística entre os dois grupos hidrocefálicos quando comparados com o grupo C ($p < 0,01$).

5.4.2 Transferência de magnetização

Quando avaliado o encéfalo total, não foram encontradas diferenças entre os grupos C, HNT e HTR, apesar do grupo HTR apresentar tendência a maior mielinização que o grupo HNT (C: $x = 38.42 \pm 4.26$; HNT: $x = 31.97 \pm 1.87$; HTR: $x = 33.54 \pm 0.39$).

Na avaliação das amostras dos córtices dorsal e ventral, nenhum grupo examinado demonstrou diferenças estatísticas (gráfico 7).

Gráfico 7 - Transferência de magnetização do encéfalo no corte coronal. A: transferência de magnetização do encéfalo total. B: transferência de magnetização da razão subcortical dorsal. C: transferência de magnetização da razão subcortical ventral, não apresentando diferenças estatísticas em nenhum dos critérios apresentados.

5.5 Avaliações histoquímicas

5.5.1 Coloração com hematoxilina e eosina

Nos ratos controles, o corpo caloso é visto como um conjunto compacto de fibras nervosas que cruzam a linha mediana do cérebro, enquanto a camada endimária que recobre os ventrículos laterais é contínua, com epitélio cúbico simples e células com núcleo centralizado (figura 4/A).

Já nos animais do grupo HNT (C) e nos animais do grupo HTR (E) observamos que os ventrículos laterais encontravam-se dilatados e apresentavam presença de pontos de rotura

com áreas de desnudamento na camada ependimária. Nos locais onde o epêndima ainda estava presente, as células ependimárias eram achatadas, comprimidas e estiradas. O corpo caloso apresentava-se também comprimido e estirado, com sinais de edema visto pelo espaçamento ou esgarçamento entre suas fibras. Nos casos mais graves de hidrocefalia o corpo caloso estava completamente destruído, entretanto, não observamos diferenças nessas estruturas entre os dois grupos hidrocefálicos.

A região da matriz germinativa localizada no ângulo externo dos ventrículos laterais e apresenta-se, nos controles, intensamente celular, de núcleo intensamente corado pela hematoxilina (B). Nos ratos hidrocefálicos, a matriz germinativa perdeu grande parte de suas células, mas não observamos diferenças na quantidade, forma e distribuição de células entre esses dois grupos (D/F).

O córtex cerebral dorsal (neocórtex) dos ratos controles apresenta seis camadas de células, que podem ser diferenciadas da superfície glial para profundidade (substância branca subcortical) em: camada molecular, camada granular externa, camada piramidal externa, camada granular interna, camada piramidal interna e camada multiforme. Nos animais hidrocefálicos, essa região do córtex examinada manteve sua laminação preservada, apesar de estar bastante comprimida e, em ratos com hidrocefalia grave, até apresentando sinais de fístula espontânea entre o ventrículo lateral e o espaço subaracnóideo acima do córtex dorsal, porém, não observamos diferenças entre os animais dos dois grupos hidrocefálicos.

Nos animais controles, a cápsula externa é visualizada no corte coronal, passando pela comissura anterior como um feixe compacto de fibras nervosas que se projeta, a partir da extremidade lateral do corpo caloso, em um trajeto arqueado de convexidade externa entre substância branca subcortical, lateralmente, e os núcleos da base, medialmente. Nos animais hidrocefálicos, a cápsula externa aparece pouco alterada nos graus mais discretos de dilatação ventricular, mas nos animais com hidrocefalia grave esta estrutura apresentava sinais de compressão e estiramento, com esgarçamentos e espaçamentos entre suas fibras. O tratamento com o Resveratrol não produziu melhorias morfológicas visualizadas nesta preparação histológica.

Figura 4 - Fotomicrografias de lâminas coradas com hematoxilina e eosina na região do corpo caloso: A: controle, C: hidrocefálico não tratado e E: hidrocefálico tratado com Resveratrol. Na região da matriz germinativa: B: controle, D: hidrocefálico não tratado e F: hidrocefálico tratado com Resveratrol. Observam-se sinais de esgarçamento e edema nos animais hidrocefálicos. Entretanto, estes sinais de lesão são mais intensos nos animais HNT (B e E: setas) que nos animais HTR (C e F: *). Objetiva de 10X. Barra 100um.

5.5.2. Histoquímica por solocromo-cianina

A coloração histoquímica por solocromo-cianina foi utilizada para medir a espessura do corpo caloso e para quantificar o grau de mielinização, sendo essa quantificação realizada através de confronto visual e aplicação de um escore de classificação da intensidade da cor azul (quanto mais intensa a tonalidade do azul, maior a quantidade de mielina).

Os ratos controles exibiram uma maior espessura do corpo caloso que os animais hidrocefálicos ($p < 0.05$), e o tratamento com o Resveratrol não produziu modificações nesta medida (C: $x = 143,36 \pm 23,19$; HNT: $x = 79,24 \pm 16,59$; HTR: $x = 81,61 \pm 10,27$). Também observamos que, nos animais hidrocefálicos, quanto maior era o grau de hidrocefalia, menor era a espessura do corpo caloso (gráfico 8).

Gráfico 8 - Espessura do corpo caloso. Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos C e HNT e entre os grupos C e HTR.

No confronto visual, os animais do grupo C exibiram uma tonalidade mais intensa de azul no corpo caloso quando comparados com os dois grupos hidrocefálicos e, na comparação entre os dois grupos de animais hidrocefálicos, a tonalidade do azul no corpo caloso dos ratos tratados com Resveratrol foi ligeiramente mais intensa que àquela exibida no corpo caloso dos ratos sem tratamento. Entretanto, ao ser atribuído um escore de classificação de intensidade do azul, os três grupos experimentais não apresentavam diferença significativa (C: $x = 1.60 \pm 0.24$; HNT: $x = 0.80 \pm 0.13$; HTR: $x = 1.20 \pm 0.13$) (figura 5).

Figura 5 - Fotomicrografias, por coloração com solocromo-cianina, da região do corpo caloso dos ratos com 21 dias de vida: A: controle. B: hidrocefálico não tratado. C: hidrocefálico tratado com Resveratrol. Observa-se maior espessura e tonalidade em azul no corpo caloso dos animais controles quando comparados com os grupos hidrocefálicos. Os animais dos grupos HNT e HTR não apresentaram diferenças nesses quesitos. Objetiva de 20X. Barra – 100 µm (*).

5.6 Avaliações por imunistoquímica

5.6.1 Estudo imunistoquímico para GFAP

No estudo por imunistoquímica para GFAP observamos que os animais hidrocefálicos exibiam uma maior marcação que os animais controles, e as estruturas mais intensamente marcadas eram o corpo caloso e a região da matriz germinativa, no ângulo externo do ventrículo lateral. Concentrando a atenção para essas regiões mais alteradas na hidrocefalia, notamos que os animais do grupo C exibiram uma marcação leve na imunistoquímica para GFAP, com os prolongamentos dos astrócitos delicados e pouco visíveis. Por outro lado, nos ratos hidrocefálicos, a marcação para GFAP nas regiões citadas era intensa, com grande número de astrócitos grosseiramente marcados, mas os animais do grupo HNT apresentaram grande quantidade de astrócitos intensamente reativos, com prolongamentos muito mais grossos e fortemente marcados que os ratos do grupo que recebeu o Resveratrol (HTR) (figura 6).

Figura 6 - Fotomicrografias de lâminas imunomarcadas para GFAP na região do corpo caloso. A: controle, C: hidrocefálico não tratado e E: hidrocefálico tratado com Resveratrol. Região da matriz germinativa: B: controle, D: hidrocefálico não tratado e F: hidrocefálico tratado com Resveratrol. O grupo HNT apresentou mais astrócitos reativos, com prolongamentos grossos quando comparados com os outros grupos experimentais. Objetiva de 40X. Barra 20μm.

Ao aplicamos um escore de intensidade de marcação para o GFAP (quanto maior o escore, maior a intensidade de marcação) observamos que os controles exibiam um escore mínimo, em comparação aos grupos hidrocefálicos, mas a diferença somente foi significativa entre os controles e os hidrocefálicos sem tratamento ($p < 0,05$). Apesar do escore dos animais tratados com Resveratrol ser ligeiramente menor que os não tratados, a diferença não foi significativa (gráfico 9).

Gráfico 9 - Categorização por escore das lâminas imunomarcadas para GFAP. A: região do corpo caloso e B: região da matriz germinativa, onde ambas apresentaram maior reação astrocitária no grupo não tratado, exibindo diferenças estatísticas apenas entre os animais C e os HNT ($p < 0,05$).

Além da avaliação qualitativa, foram quantificados os astrócitos reativos dentro de uma área demarcada no corpo caloso e calculada a densidade dos mesmos. Foram observadas diferenças significativas da densidade de astrócitos reativos entre os grupos C e HNT ($p < 0,05$) e entre os grupos HNT e HTR ($p < 0,01$) (C: $x = 0.00 \pm 0.00$; HNT: $x = 249.24 \pm 64.82$; HTR: $x = 49.97 \pm 19.38$).

Gráfico 10 - Densidade de astrócitos intensamente marcados na região do corpo caloso. Observou-se maior quantidade de astrócitos nos animais não tratados, com diferença estatística entre os grupos C e HNT ($p < 0,05$) e entre os grupos HNT e HTR ($p < 0,01$). Região da matriz germinativa sem diferença significativa entre os grupos.

5.6.2 Estudo imunoistoquímico para Ki-67

Os ratos controles apresentavam a região da matriz germinativa, no ângulo externo do ventrículo lateral, intensamente celular, com células pequenas, de núcleo basofílico em azul intenso, com grande número de células marcadas pelo anticorpo anti-Ki67. Analisando os dois grupos hidrocefálicos, verificamos que a matriz germinativa era menos povoada de células, com número de células marcadas muito reduzido em relação aos controles ($p < 0,01$). Entretanto, não foi observada diferença na contagem de células marcadas entre os dois grupos hidrocefálicos (C: $x = 29,00 \pm 4,53$; HNT: $x = 0,10 \pm 0,10$; HTR: $x = 0,63 \pm 0,24$) (figura 7/ gráfico11).

Figura 7 - Fotomicrografias de lâminas imunomarcadas para Ki67 na região da matriz germinativa. A: controle, B: hidrocefálico não tratado e C: hidrocefálico tratado com Resveratrol. Grupo controle com maior número de células marcadas (setas) quando comparados com os outros grupos experimentais. Objetiva de 40X. Barra 20um.

Gráfico 11 - Médias entre os grupos experimentais referentes à densidade de células em divisão mitótica. Observa-se diferenças significativas ($p < 0,01$) entre o grupo controle quando comparados com os dois grupos hidrocefálicos.

5.7 Análises bioquímicas

5.7.1 Dosagem dos antioxidantes totais presentes no plasma

Os animais do grupo HTR apresentaram um aumento na capacidade total de antioxidantes presentes no plasma, quando comparados com os outros dois grupos, porém a diferença estatística ($p < 0,05$) só foi encontrada entre os dois grupos hidrocefálicos (HTR > HNT) (C: $x = 0,71 \pm 0,05$; HNT: $x = 0,71 \pm 1,88$; HTR: $x = 1,03 \pm 0,10$).

Gráfico 12 - Capacidade total de antioxidantes. Observa-se aumento significativo na quantidade de antioxidantes presentes no plasma dos animais HTR quando comparados com os animais do grupo HNT ($p < 0,05$). Os valores obtidos representam a absorbância.

5.7.2 Avaliação da peroxidação lipídica pelo método *TBARS* no tecido cerebral

Para avaliação da peroxidação lipídica foi realizada a dosagem do malondialdeído, um de seus produtos, através do método *TBARS*. Não encontramos diferenças significativas entre os três grupos avaliados (C: $x = 8,00 \pm 1,26$; HNT: $x = 8,46 \pm 0,56$; HTR: $x = 7,92 \pm 0,59$).

Gráfico 13 - Dosagem de radicais livres no tecido cerebral medidas através da dosagem de Malondialdeído pelo teste TBARS. Os três grupos não apresentaram diferenças significativas.

5.7.3 Dosagem da glutathiona peroxidase no tecido cerebral

Não foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos analisados, apesar dos animais do grupo HTR apresentarem uma tendência favorável da ação da enzima glutathiona peroxidase, do que os animais do grupo HNT no tecido cerebral. (C: $x = 37.89 \pm 10.73$; HNT: $x = 20.64 \pm 4.83$; HTR: $x = 73.53 \pm 27.77$).

Gráfico 14 - Dosagem de glutathiona medida através da atividade GPx.
Os três grupos não apresentaram diferenças significativas na ação da enzima glutathiona peroxidase.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Para desenvolver a dilatação ventricular na hidrocefalia experimental utilizamos o método de indução com injeção intracisternal de caulim devido ao seu baixo custo, por ser de elevado índice de sucesso e não necessitar de procedimentos cirúrgicos que pudessem causar alterações de estruturas anatômicas (HOCHWALD, 1985). O volume da suspensão utilizada em cada animal foi de 0,04 ml, sendo a quantidade adequada para causar hidrocefalia, mas com graus de dilatação ventricular que permitiam uma sobrevida, sem sinais de sofrimento animal, importante até os tempos experimentais estudados. Importante destacar que a aplicação do caulim pode produzir vários graus de hidrocefalia, uma vez que não conseguimos controlar completamente o grau de dilatação ventricular.

Após a aplicação de caulim foi possível observar alterações clínicas que são similares às aquelas encontradas em crianças, como exemplo: a macrocrania ou formato abaulado da cabeça, letargia e posicionamento dos olhos voltados para baixo, denominado como “olhar do sol poente”.

Johnson e colaboradores, no estudo de hidrocefalia realizado em 1999 utilizando cães adultos, observaram muitos sinais e sintomas clínicos semelhantes aos por nós observados: fraqueza, ataxia, base alargada durante a marcha. Essas mesmas características foram apontadas e analisadas por Green e colaboradores, em 2007, em crianças, somadas a distúrbios visuais e protusão das fontanelas.

Para o estudo do peso corporal dos três grupos foi realizado a análise do ganho ponderal diário, no qual podemos destacar que os animais apresentavam peso semelhante no P0, no entanto mencionamos que houve um viés dos animais do grupo HNT, que vieram do biotério com mais peso. Importante considerar que as caixas deveriam ser mescladas apresentando os três grupos experimentais, por caixa, de forma com que não houvesse alterações nos resultados, o que pode ser observado nos animais do grupo HNT que não tiveram a mesclagem da caixa, apresentando portanto maior peso, sem diferenças significativas. A partir do P2 os animais do grupo HTR passaram a receber a dosagem diária de Resveratrol o que ocasionou uma perda de peso quando comparados com os demais grupos. Ao longo do experimento os animais foram ganhando peso, mas sem apresentar diferenças significativas, no entanto vale destacar que os animais HTR apresentaram menor ganho do começo ao fim. Tal fato pode ser observado devido o estresse provocado pela indução do caulim e também pelo estresse diário da aplicação da injeção com Resveratrol.

CATALÃO e colaboradores (2014) observaram que na comparação entre os animais hidrocefálicos tratados com polifenol galato de epigallocatequina e não tratados, os animais tratados apresentaram menor ganho ponderal com diferenças significativas, podendo ser explicado pelo fato do estresse adicional com medicamento diário.

Pelo fato do peso inicial dos animais HNT ser maior que o peso dos demais grupos, realizamos o cálculo da porcentagem de peso em relação ao peso inicial nos três grupos experimentais. Na primeira metade do experimento (P0 ao P7) os animais do grupo controle dobraram o peso (100% de ganho ponderal), enquanto os animais do grupo HNT tiveram um ganho de 80% em relação ao peso inicial e os animais HTR ganharam apenas 47%. Na segunda metade do experimento (P7 ao P14) os ratos hidrocefálicos, especialmente os que receberam Resveratrol, tiveram uma tendência de compensação do ganho ponderal, sem, entretanto, diferença significativa. Já na análise geral (P0 ao P14), os animais controles tiveram maior porcentagem de ganho de peso que os dois grupos hidrocefálicos.

Um dos testes de comportamento que utilizamos foi o teste de campo aberto (*Open field*), que tinha por finalidade avaliar o desenvolvimento sensório-motor, comportamento deambulatorio e atividade exploratória. O mesmo teste foi utilizado por Lopes et al. (2009), com resultados semelhantes aos nossos. Nos primeiros dias de teste (P6, P8 e P10) os três grupos estudados não apresentaram diferenças significativas, apesar dos animais dos grupos C e HTR exibirem melhor desempenho e escores do que os animais do grupo HNT. Durante esse período os animais mostraram uma dificuldade na execução da marcha, apresentando uma curvatura cifótica dorsal, ataxia, marcha com desequilíbrio e base alargada. Estes sinais são considerados dentro dos padrões em ratos com essa idade, pois o encéfalo do animal não completou o seu desenvolvimento e maturação (GESELL, 2003). Em P12 os animais controles apresentavam o escore máximo conferido, com diferenças significativas quando comparados com os animais do grupo HNT. Em contrapartida destacamos que os dois grupos hidrocefálicos obtiveram escores menores, não apresentando diferenças estatísticas em P12, mas no P14 houve diferença entre os grupos, quando os animais tratados com Resveratrol apresentaram melhor desempenho, se igualando ao grupo controle.

Para analisar a memória e aprendizagem espacial dos animais foi aplicado o teste de Labirinto aquático de Morris (*Water maze*). Em P9 foi realizado o treino para reconhecimento e exploração do ambiente e em P10 e P11 foi aplicado o teste em dois turnos. Utilizamos os parâmetros de acordo com os publicados por pesquisadores que realizaram o mesmo teste para avaliar a aprendizagem e memória de ratos hidrocefálicos através de um trajeto aquático referenciado até uma plataforma submersa (DEL BIGIO; WILSON; ENNO, 2003; HU et

al.,2014). Analisando o teste realizado em P10, no período da manhã, foi observado que os três grupos experimentais conseguiram alcançar a plataforma em tempos semelhantes. O teste foi executado também em P10, no período da tarde, e visto que os animais HTR atingiram a plataforma com melhor desempenho quando comparados com os outros dois grupos. Apesar de não ter apresentado diferenças estatísticas, esse resultado pode ser atribuído ao fato dos animais terem aprendido a encontrar mais rapidamente a plataforma submersa. Foi observado novamente o teste realizado em P11 cujos resultados apresentados no período da manhã mostraram que os ratos do grupo controle tiveram melhor desempenho que os demais grupos hidrocefálicos. Apesar do desempenho com menor tempo de nado até a plataforma para os animais tratados com Resveratrol, somente foram observadas diferenças estatísticas entre os animais controle e hidrocefálicos não tratados. No teste executado em P11 no período da tarde o desempenho dos animais dos três grupos experimentais não foi diferente.

Os testes comportamentais, *open field* e *water maze*, mostraram que os animais hidrocefálicos tiveram o comportamento prejudicado, enquanto os animais tratados com Resveratrol exibiram uma discreta melhora. Entretanto, a diferença pouco significativa dos animais tratados com Resveratrol pode ser explicada pela sensibilidade baixa dos testes aplicados.

Para calcularmos o grau de dilatação ventricular dos animais hidrocefálicos foi realizado o exame de ressonância magnética. Nesse mesmo exame foi analisada a transferência de magnetização para quantificação da mielina em áreas específicas. Conforme observado, os animais hidrocefálicos apresentavam graus variados de hidrocefalia, mas a razão ventricular entre os dois grupos hidrocefálicos, não tratados e tratados com Resveratrol, foi similar, porém quando comparados com o grupo controle, o tamanho ventricular era muito menor nos ratos sem hidrocefalia. Por outro lado, o uso do Resveratrol não interferiu com o tamanho ventricular, o que já era esperado, pois essa droga tem reconhecido poder antioxidante, mas não teria suficiente poder antiinflamatório para impedir ou reduzir a ventriculomegalia.

Diferentes técnicas de ressonância magnética têm sido utilizadas em estudos sobre hidrocefalia, não só para medir o grau de dilatação ventricular, mas também com o objetivo de quantificar a mielina e avaliar a concentração dos metabólitos resultantes da degradação do tecido cerebral (YAMADA et al., 1992; BRAUN et al., 1997; CORKILL et al., 2003; YUAN et al., 2009; CASTRO et al., 2012). A técnica de transferência de magnetização como método de quantificação da mielina já foi estabelecida, mas é nova no estudo da hidrocefalia experimental (CATALAO et al., 2014). Em nosso estudo não observamos diferenças entre os

três grupos experimentais, apesar de haver uma tendência a maior mielinização do grupo tratado com Resveratrol, quando comparado com o outro grupo hidrocefálico sem intervenção medicamentosa. Os dados de transferência de magnetização foram obtidos através de demarcações de áreas de interesse (ROI), sendo realizadas nas regiões dorsal e ventral do ventrículo lateral, no plano coronal médio. Esta análise é baseada na troca de magnetização entre prótons, que estão vinculados a grandes moléculas de baixa mobilidade, como a mielina, e prótons móveis em água livre (GOZZI et al., 2012). A quantificação da taxa de MTR é utilizada para investigar o grau de destruição do tecido do sistema nervoso central, em seres humanos e animais, já que as reduções nos valores de MTR são imputadas à diminuição da integridade de macromoléculas, refletindo os danos da mielina (NEWBOULD et al., 2014), da membrana axonal, ou diluição de macromoléculas em edema inflamatório (ZAARAOUI et al., 2008). Em estudo de hidrocefalia prévio, realizado por nosso grupo, foi demonstrado que a MTR está relacionada à lesão da substância branca periventricular pela hidrocefalia, com valores reduzidos em relação aos controles. Quando os ratos hidrocefálicos eram tratados com derivação liquórica e esta estava funcionando, os valores de MTR voltavam a se aproximar daqueles obtidos nos encéfalos de ratos normais (CATALÃO et al., 2014). Os resultados obtidos em nosso estudo mostraram que, na análise do encéfalo total, os animais do grupo controle apresentavam valores de transferência de magnetização ligeiramente maiores do que os animais dos grupos hidrocefálicos. Entretanto, o tratamento com o Resveratrol não foi suficiente para recuperar ou impedir a lesão da mielina nas estruturas periventriculares.

Através da preparação histológica com coloração por hematoxilina e eosina, analisamos o encéfalo para estudar as lesões provocadas pela hidrocefalia e as possíveis interferências introduzidas com o uso do Resveratrol. Além de uma visão panorâmica do encéfalo no corte coronal médio (quiasma óptico como referência externa), foram avaliadas determinadas regiões encefálicas como o corpo caloso, matriz germinativa, cápsula externa e núcleos da base, que foram escolhidas pela proximidade das mesmas com as cavidades ventriculares. Os animais dos dois grupos hidrocefálicos exibiram presença de pontos de rotura no epêndima, com áreas de desnudamento completo. O corpo caloso apresentava-se comprimido e estirado, com sinais de edema visto pelo espaçamento ou esgarçamento entre suas fibras e, nos casos mais graves de hidrocefalia, o corpo caloso estava completamente destruído e a matriz germinativa com grande perda celular. O córtex cerebral dos animais hidrocefálicos manteve sua laminação preservada, apesar de estar bastante comprimido, e a cápsula externa aparece pouco alterada nos graus mais discretos de dilatação ventricular, mas nos animais com hidrocefalia grave esta estrutura apresentava esgarçamentos e espaçamentos

entre suas fibras, ou ainda clivagem completa paralela às suas fibras. As lesões visualizadas nestas estruturas eram mais exuberantes quanto mais graves eram os graus de ventriculomegalia. Comparando os dois grupos hidrocefálicos percebemos que o tratamento com o Resveratrol não produziu melhorias morfológicas identificáveis sob a microscopia de luz, mostrando que provavelmente o Resveratrol contribuiu para melhora molecular, sem proteger as lesões mecânicas.

A análise pelo método histoquímico com solocromo cianina foi realizada para quantificar o grau de mielinização da substância branca periventricular, em especial do corpo caloso. Em nossos resultados encontramos prejuízo na mielinização dessa estrutura nos animais dos dois grupos hidrocefálicos, notado pela menor intensidade da coloração azul. Por outro lado, observamos que o corpo caloso era ligeiramente mais corado em azul nos animais tratados com Resveratrol que nos não tratados, mostrando um possível efeito neuroprotetor para mielina nesses animais. Catalão e colaboradores (2014) utilizaram da mesma técnica para verificar a mielinização de ratos hidrocefálicos com e sem tratamento, utilizando o polifenol galato de epigallocatequina, encontrando em seus resultados nítida diferença visual na intensidade da cor azul, ou seja, o corpo caloso estava fortemente corado em azul no grupo de ratos hidrocefálicos tratados com o polifenol, sugerindo melhor padrão de mielinização dessa região, assim como encontrado em nosso trabalho, comprovando uma possível ação benéfica desses polifenóis agindo na mielinização.

Na medida da espessura do corpo caloso obtemos de forma indireta um parâmetro de acordo com o grau de dilatação ventricular, deste modo podemos associar a gravidade da ventriculomegalia ao nível da lesão (quanto maior era o grau de hidrocefalia, menor era a espessura do corpo caloso). Os ratos controles exibiram maior espessura do corpo caloso que os animais dos dois grupos hidrocefálicos com diferenças estatísticas entre eles. Podemos destacar que o seu possível efeito neuroprotetor não tem a capacidade de agir diretamente no impedimento ou diminuição da progressão da dilatação ventricular, mas sim nos mecanismos biomoleculares relacionados à cascata oxidativa, que por sua vez promove lesões no parênquima cerebral através da geração de radicais livres.

No estudo da análise por imunoistoquímica para o anticorpo GFAP, quantificamos os astrócitos reativos imunomarcados na região do corpo caloso. Os astrócitos eram considerados reativos quando apresentavam-se intensamente marcados e com prolongamentos grossos. Calculamos ainda a densidade dos mesmos dentro de uma área demarcada e observamos que os animais hidrocefálicos sem tratamento exibiam astrócitos fortemente marcados e com prolongamentos alargados em sua base junto ao cariócito, ao contrário dos

animais hidrocefálicos tratados com Resveratrol, que apresentavam astrócitos mais delicados com prolongamentos finos. Por outro lado, nos animais do grupo controle os astrócitos eram parcamente imunomarcados, com prolongamentos muito delicados. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Wang e colaboradores em 2002, onde foi evidenciado que o Resveratrol diminuiu consideravelmente a quantidade de astrócitos reativos após a lesão isquêmica cerebral pelo bloqueio da artéria carótida. A reação astrocitária é frequentemente observada na reparação e cicatrização do SNC secundariamente a diversos processos patológicos. Quando ocorre uma agressão ao SNC, os astrócitos são ativados reparando os danos ao tecido, limitando-os e restaurando a homeostase (BELANGER et al., 2011; PARPURA et al., 2012). Em nosso estudo, como já observado por outros autores (LOPES et al., 2009), a reação astrocitária predomina e foi mais exuberante no corpo caloso. Este fato pode ser explicado pela localização dessa estrutura, imediatamente acima do ventrículo lateral dilatado, pela natureza do tecido aí encontrado, ou seja, o corpo caloso é formado por substância branca (fibras nervosas e células gliais), reconhecidamente mais suscetível às lesões da hidrocefalia que a substância cinzenta. Ainda é preciso considerar que o corpo caloso encontra-se no centro da região do encéfalo mais distorcida pela ventriculomegalia, já que, em animais muito jovens, os ossos do crânio ainda não soldados permitem abaulamentos da calota craniana, em proporções relacionadas ao grau de hidrocefalia (DEL BIGIO; WILSON; ENNO, 2003). Isto pode também explicar o que foi observado na matriz germinativa: a densidade de astrócitos reativos não apresentava diferenças entre os grupos experimentais, ainda que o escore demonstrasse maior atividade astrocitária no grupo hidrocefálico não tratado, quando comparado com os animais controles.

No estudo imunoistoquímico para o Ki-67 realizamos a contagem das células em divisão mitótica, imunomarcadas na região da matriz germinativa. Caracteristicamente, os animais controles exibiam uma intensa celularidade nessa região, com um grande número de células marcadas para o Ki-67, já que os ratos nessa fase de desenvolvimento têm ainda seus encéfalos em maturação e, portanto, ainda com células em proliferação. Por outro lado, os animais hidrocefálicos e os hidrocefálicos tratados com Resveratrol apresentaram imunomarcção discreta quando comparados aos controles, podendo tal resultado ser explicado pela proximidade dessa região da matriz germinativa com os ventrículos laterais do cérebro, uma vez que tal proximidade faz com que as células se tornem um alvo aos danos provocados pela dilatação dessas cavidades. Também no estudo de Lopes et al. (2009) foi observado que camundongos controles, com 14 dias de vida, apresentavam grande proliferação celular na zona subependimária do córtex, enquanto os animais hidrocefálicos de

mesma idade apresentavam baixa celularidade na imunomarcagem com Ki-67, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, assim como no nosso trabalho.

Como já descrito, o Resveratrol é considerado um potente antioxidante de radicais livres e seu papel neuroprotetor é atuar especificamente sobre as alterações bioquímicas e moleculares provenientes da liberação de espécies reativas de oxigênio, desta forma, a atuação do Resveratrol se torna significativa ao pensarmos em sua capacidade de agir nas bases estruturais da dilatação ventricular, ao tentar impedir e reduzir a evolução da doença até o momento ideal para a realização da cirurgia de derivação liquórica, uma vez que a dilatação ventricular progressiva não pode ser impedida com a medicação. Devido as complicações que a cirurgia de derivação pode acarretar e, durante a indecisão perante a realização dessa cirurgia, a espera pode levar o paciente à sérios agravos como a isquemia, ocorrendo assim formação de radicais livres. O intuito do Resveratrol é atuar, com seu efeito neuroprotetor, diminuindo ou até mesmo prevenindo as lesões ocasionadas pelo acúmulo e atuação de metabólitos nocivos ao parênquima cerebral.

As análises bioquímicas foram realizadas através de dosagens dos antioxidantes totais presentes no plasma, quantificação da peroxidação lipídica pelo método TBARS e dosagem da enzima glutatona, no tecido cerebral.

Na quantificação dos antioxidantes presentes no plasma, os animais tratados com Resveratrol exibiram aumento relevante quando comparados com o grupo hidrocefálico, demonstrando que o Resveratrol foi absorvido, fazendo com que os antioxidantes aumentassem. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Bellaver em 2014, que analisaram a região do hipocampo de ratos Wistar recém nascidos, adultos e idosos, demonstrando aumento das defesas antioxidantes nesses animais que também receberam Resveratrol, comprovando assim mais uma vez seu efeito benéfico no cérebro.

O nível de estresse oxidativo causado pelos radicais livres no organismo foi determinado pela peroxidação lipídica, sendo um marcador importante do estresse oxidativo e um dos fatores envolvidos no dano celular, causado pelos radicais (BALU et al., 2005). O MDA, formado a partir da quebra de ácidos graxos poliinsaturados, serve como um indicador para determinar a extensão da peroxidação lipídica, uma vez que pode ocorrer o aumento após uma lesão tecidual. Para avaliação do malondialdeído foi quantificada substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, no qual não foi encontradas diferenças significativas na média do nível de MDA, entre os 3 grupos analisados. Tal achado pode ser comparado ao estudo de pesquisadores que utilizaram de um conjunto de fármacos antioxidantes, destacando que animais hidrocefálicos tratados, assim como os de nosso trabalho, não obtiveram um aumento

nos níveis de MDA (DI CURZIO; TURNER-BRANNEN; DEL BIGIO, 2014). Importante ainda ressaltar que alguns estudos sugerem que o Resveratrol exerce seus efeitos benéficos somente em animais que possuem aumento de estresse oxidativo, entretanto, outros autores demonstraram efeitos do Resveratrol somente em ratos saudáveis (MOKNI et al., 2007; SOYLEMEZ et al., 2009).

Foi realizada a dosagem da glutathione peroxidase, uma enzima endógena com ação antioxidante, que possui uma função importante no armazenamento e transporte de cisteína na defesa celular, agindo contra os radicais livres, peróxidos e xenobióticos, participando na modulação de transdução de sinal, regulação da proliferação celular e regulação da resposta imune. A glutathione peroxidase se torna reduzida ao ocorrer a presença de radicais livres e estresse oxidativo, uma vez que é consumida na regulação e limpeza desses produtos. (SIES, 1999). Nas dosagens enzimáticas no tecido encefálico, considerando seu consumo ao decorrer do tempo, não foram encontradas diferenças significativas nos três grupos experimentais.

Podemos, assim, concluir que o Resveratrol tem um papel como neuroprotetor relativo na hidrocefalia experimental induzida em ratos jovens. Esses efeitos neuroprotetores foram observados especialmente na redução da reação astrocitária no corpo caloso e no desempenho nos testes de comportamento. Por outro lado, ainda que a dosagem de antioxidantes totais no plasma tenha sido maior no grupo tratado, demonstrando a eficácia em promover o aumento desses elementos no sangue após a administração via intraperitoneal da droga, não obtivemos o aumento significativo da ação da mesma no tecido cerebral. É preciso realçar ainda que, ao contrário de outros autores (MAHDI; ABDELSALAM; AGHA, 2014), observamos que a dosagem de radicais livres nos animais dos três grupos experimentais, controle, hidrocefálico sem tratamento e hidrocefálicos tratados com Resveratrol foi semelhante, de forma que não podemos garantir que a produção aumentada de radicais livres seja um mecanismo importante de lesão na hidrocefalia. Acreditamos que serão necessários estudos futuros que envolvam a associação da administração do Resveratrol com o tratamento da hidrocefalia por derivação líquórica, e a mudança da via de administração da droga para oral, pois algumas publicações relatam a maior eficácia antioxidante do Resveratrol após administração por esta via, podendo esta melhor resposta estar associada a mudanças que a flora intestinal possa promover na estrutura da droga (SHINDLER et al., 2010). Como dosamos os radicais livres globalmente no encéfalo, diferenças localizadas podem ter sido mascaradas. Em trabalhos futuros planejamos ainda a dosagem desses radicais em regiões exclusivas do encéfalo, reconhecidamente mais afetadas na hidrocefalia.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Podemos concluir com as análises dos resultados que:

1. Os animais hidrocefálicos que receberam diariamente injeção de Resveratrol apresentaram efeito benéfico nos testes comportamentais, mostrando mais agilidade e melhor exploração do ambiente, melhor desenvolvimento sensoriomotor, aprendizagem e capacidade de memorização;
2. Através da avaliação histológica por solocromo-cianina comprovamos que a hidrocefalia prejudica a mielinização das estruturas periventriculares.
3. Houve discreta diminuição da atividade astrocitária evidenciada pela imunomarcção do GFAP no corpo caloso dos ratos que receberam medicamento;
4. A dilatação ventricular progressiva na hidrocefalia leva ao desaparecimento das células migratórias na região da matriz germinativa evidenciada pela imunomarcção do Ki-67.
5. Os animais tratados com Resveratrol exibiram aumento significativo na quantidade de antioxidantes totais no plasma.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, D.; BROWNE, R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. **Advances in Experimental Medicine Biology**, v. 366, n., p.43-58. 1994.
- ATES, O. et al. Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 294, n. 1-2, Jan, p.137-144. 2007.
- BALU, M.; SANGEETHA, P.; HARIPRIYA, D.; PANNEERSELVAM, C. Rejuvenation of antioxidant system in central nervous system of aged rats by grape seed extract. **Neuroscience**, v. 383, n.3, p. 295-300. 2005.
- BELANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P.J. Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metabolism**, v. 14, p.724-738. 2011.
- BELLAVER, B.; SOUZA, D.G.; SOUZA, D. O.; QUINCOZES-SANTOS, A. Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. **Toxicology in vitro: an International Journal published in Association with BIBRA**, v. 28, n.4, June, p.479-484. 2014.
- BERTELLI, A. A. et al. Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. **International Journal of Tissue Reactions**, v. 17, n.1, p.1-3. 1995.
- BISHAYEE, A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. **Cancer Prevention Research (Philadelphia)**, v. 2, n.5, May, p.409-418. 2009.
- BOSCOLO, P., et al. Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 33, n.2, Feb, p.226-31. 2003.
- BRAUN, K. P. et al. In vivo ¹H MR spectroscopic imaging and diffusion weighted MRI in experimental hydrocephalus. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 40, n.6, Dec, p.832-839. 1998.
- _____. Cerebral ischemia and white matter edema in experimental hydrocephalus: a combined in vivo MRI and MRS study. **Brain Research**, v. 757, n. 2, May 23, p.295-298. 1997.
- BRODBELT, A.; STOODLEY, M. CSF pathways: a review. **British Journal of Neurosurgery**, v. 21, n. 5, Oct, p.510-520. 2007.
- CASTRO, S. C. et al. 1T magnetic resonance image in the study of experimental hydrocephalus in rats. Accuracy of the method in the measurements of the ventricular size. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 27, n. 11, Nov, p.768-772. 2012.
- CATALAO, C. H.; CORREA, D. A.; SAITO, S. T.; LOPES LDA, S. Camellia sinensis neuroprotective role in experimentally induced hydrocephalus in Wistar rats. **Childs**

Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society of Pediatric Neurosurgery, v. 30, n. 4, Apr, p.591-597. 2014.

CAVALCANTI, D. P.; SALOMÃO, M.A. Incidência de hidrocefalia congênita e o papel do diagnóstico pré-natal. **Jornal de Pediatria**, v.79, n. 2, p.135-140. 2003

CHUKWUMAH, Y. C. et al. Effect of frequency and duration of ultrasonication on the extraction efficiency of selected isoflavones and trans-resveratrol from peanuts (*Arachis hypogaea*). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 2, Feb, p.293-299. 2009.

CORKILL, R. G. et al. Multi-modal MRI in normal pressure hydrocephalus identifies pre-operative haemodynamic and diffusion coefficient changes in normal appearing white matter correlating with surgical outcome. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 105, n. 3, Jul, p.193- 202. 2003.

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

DADLANI, R. et al. Occam's razor in the management of ventriculoperitoneal shunt dysfunction: Diagnosis and management of an unusual pediatric case. **Asian Journal Neurosurgery**, v. 10, n. 2, Apr-Jun, p.177-180. 2015.

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

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

_____. et al. Acute and chronic cerebral white matter damage in neonatal hydrocephalus. **The Canadian Journal of Neurological Science. Le Journal canadien des Sciences neurologiques**, v. 21, n. 4, Nov, p.299-305. 1994.

_____. WILSON, M. J.; ENNO, T. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. **Annals Neurology**, v. 53, n. 3, Mar, p. 337-46, 2003.

DELMAS, D.; JANNIN, B.; Latruffe, N. Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, n. 5, May, p.377-395. 2005.

DI CURZIO, D. L.; TURNER-BRANNEN, E.; DEL BIGIO, M. R. Oral antioxidant therapy for juvenile rats with kaolin-induced hydrocephalus. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 11, Oct, p.23. 2014.

DOYLE, P. W.; MATTA, B. F. Burst suppression or isoelectric encephalogram for cerebral protection: evidence from metabolic suppression studies. **British Journal of Anaesthesia**, v. 83, n. 4, Oct, p.580-584. 1999.

DRAKE, J. M. The surgical management of pediatric hydrocephalus. **Neurosurgery**, v. 62 Suppl 2, n., Feb, p.633-640; discussion 640-632. 2008.

DREHER, D.; JUNOD, A. Role of oxygen free radical in cancer development. **European Journal of Cancer**, New York, v. 32 A, n.30-38, Jan.1996.

DU, F.Y.; XIAO, X. H.; LI, G. K. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizma Polygoni Cuspidati*. **Journal of Chromatograph A**, v.1140, Nov, p. 56-62. 2007.

FINAUD, J. et al. Antioxidant status and oxidative stress in professional rugby players: evolution throughout a season. **International Journal of Sports Medicine**, v. 27, Feb, p.87-93. 2006.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, Nov 9, p.239-247. 2000.

FORSTROM, J. W.; ZAKOWSKI, J. J.; TAPPEL, A. L. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. **Biochemistry**, v. 17, n. 13, Jun 27, p.2639-2644. 1978.

FUHRMAN, B. et al. Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient (E0) mice and reduce macrophage atherogenicity. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 4, Apr, p.722-728. 2005.

GESELL, A. **A criança de 0 a 5 anos**. São Paulo: Martins Fontes, 2003.

GOZZI, M., et al. A magnetization transfer imaging study of corpus callosum myelination in young children with autism. **Biological Psychiatry**, v. 72, n. 3, Aug 1, p.215-220. 2012.

GREEN, A. L; et al. The changing face of pediatric hydrocephalus: A decade's experience. **Journal of Clinical Neuroscience**. v. 14, Nov, p. 1049-1054, 2007

GUPTA, Y. K.; CHAUDHARY, G.; SRIVASTAVA, A. K. Protective effect of resveratrol against pentylenetetrazole-induced seizures and its modulation by an adenosinergic system. **Pharmacology**, v. 65, n. 3, Jul, p.170-174. 2002.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, n. 9210, Apr 1, p.1179-1180. 2000.

_____. GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford. 2007.

HASLAM, R. H. A. The Nervous System. In: BEHRAN, R. E.; KLIEGMAN, R. M.; JENSON, H.; NELSON, W. E. Nelson. **Textbook of Pediatrics**. 16 th ed. WB Saunders Company: Philadelphia, 2000.

HATHWAY, D. E.; SEAKINS, J. W. T. Hydroxystilbenes of *Eucalyptus wandoo*. **The Biochemical Journal**., v.72, Jul, p.369-374. 1959.

HOCHWALD, G. M. Animal models of hydrocephalus: recent developments. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 178, n. 1, Jan, p.1-11. 1985.

HU, Q.; VAKHMJANIN, A.; LI, B.; TANG, J.; ZHANG, J. H. Hyperbaric oxygen therapy fails to reduce hydrocephalus formation following subarachnoid hemorrhage in rats. **Medical Gas Research**, v. 4, n., p.12. 2014.

HUANG, S. S. et al. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. **Life Sciences**, v. 69, n. 9, Jul 20, p.1057-1065. 2001.

JANG, M. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, Jan 10, p.218-220. 1997.

JANSSEN, L. J. et al. Excitatory and inhibitory actions of isoprostanes in human and canine airway smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 295, n. 2, Nov, p.506-511. 2000.

JEANDET, P. et al. Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p.579089. 2012.

JOHNSON, M. J; et al. Development and characterization of an adult model of obstructive hydrocephalus. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 91, Sept, p. 55-65, 1999.

KING, R. E.; BOMSER J. A; MIN, D. B. Bioactivity of resveratrol. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 3, Aug, p.65-69.2006.

KAPLAN S. et al. Resveratrol, a natural red wine polyphenol, reduces ischemia-reperfusion-induced spinal cord injury. **The Annals of Thoracic Surgery**. v.80, n. 6, Dec, p.2242–2249. 2005

KIZILTEPE, U. et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. **Journal of Vascular Surgery**, v. 40, n. 1, Jul, p.138-145. 2004.

LANGCAKE, P.; PRYCE, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. **Physiological Plant Pathology**, v.9, n.1, Jul, p.77-86.1976.

LIU, M. et al. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. **Human Reproduction**, v. 28, n. 3, Mar, p.707-717. 2013.

LOPES, L. S.; MACHADO, H. R.; LACHAT, J. J. Estudo do corpo caloso de ratos Wistar submetidos à hidrocefalia experimental. **Acta Cirúrgica Brasileira** [online], vol.18, suppl5, p. 10-14. 2003.

_____. SLOBODIAN, I.; DEL BIGIO, M. R. Characterization of juvenile and young adult mice following induction of hydrocephalus with kaolin. **Experimental Neurology**, v. 219, n. 1, Sep, p.187-196. 2009.

MAHDI, Z. K.; ABDELSALAM, R, M.; AGHA, A, M. Resveratrol alleviates oxidative stress and inflammation in the hippocampus of rats subjected to global cerebral ischemia/reperfusion: Comparison with vitamin E. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.8, n.27, July, p.727-736. 2014.

MCALLISTER, J. P., 2ND. Pathophysiology of congenital and neonatal hydrocephalus. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 17, n. 5, Oct, p.285-294. 2012.

MOBASHERI, A.; SHAKIBAEI, M. Osteogenic effects of resveratrol in vitro: potential for the prevention and treatment of osteoporosis. **Annals of the New York Academy Science**, v. 1290, n., Jul, p.59-66. 2013.

MOKNI, M. et al. Effect of resveratrol on antioxidant enzyme activities in the brain of healthy rat. **Neurochemistry Research**, v. 32, n. 6, Jun, p.981-987. 2007.

MUNCH, T. N. et al. Familial aggregation of congenital hydrocephalus in a nationwide cohort. **Brain**, v. 135, n. Pt 8, Aug, p.2409-2415. 2012.

NEWBOULD, R. D.; et al. Age independently affects myelin integrity as detected by magnetization transfer magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. **Neuroimage: Clinical**, v. 4, Mar, p.641-648. 2014.

NORTON, W. T. et al. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. **Neurochemical Research**, v. 17, n. 9, Sep, p.877-885. 1992.

PARPURA, V., et al. Glial cells in (patho)physiology. **Journal of Neurochemistry**, v.121, Feb, p.4-27. 2012.

PARKER, J. A. et al. Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons. **Nature Genetics**, v. 37, n. 4, Apr, p.349-350. 2005.

PEREIRA, J. et al. Neuroendoscopia no tratamento da hidrocefalia obstrutiva. **Acta Médica Portuguesa**, v.15, p.355-364. 2002.

PRATES, M. A.; ZANON-COLLANGE, N. Hidrocefalia. In: BRAGA, F. M.; MELO, P. M P. **Neurocirurgia: Série Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar**. São Paulo: Manole. 2005.

RAMEL, A.; WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 1, Feb, p.2-6. 2004.

ROMERO, P., et al. Epididymal adenomatoid tumor. Review of the national literature and report of a case. **Actas Urológicas Españolas**, v. 20, n. 9. Oct, p.839-43. 1996.

SOYLEMEZ, S. et al. The effect of long-term resveratrol treatment on relaxation to estrogen in aortae from male and female rats: role of nitric oxide and superoxide. **Vascular Pharmacology**, v. 49, n. 2-3, Aug-Sep, p.97-105. 2008.

SHINDLER K. S. et al. Oral resveratrol reduces neuronal damage in a model of multiple sclerosis. **Journal of neuro-ophthalmology: the official journal of the North American Neuro Ophthalmology Society**, v. 30, n. 4, Dec, p.328-339. 2010.

SHOESMITH, C. L.; BUIST, R.; DEL BIGIO, M. R. Magnetic resonance imaging study of extracellular fluid tracer movement in brains of immature rats with hydrocephalus. **Neurological Research**, v. 22, n. 1, Jan, p.111-116. 2000.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L.L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **American Journal Enology and Viticulture**, v.43, p.49-52. 1992.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, Jul 15, p.213-219. 1993.

_____. Glutathione and its role in cellular functions. Elsevier, **Free Radical Biology e Medicine**, v. 27, n. 9, p. 916-920. 1999.

STAUFFER, U.G. Mal formações cirúrgicas do crânio e do encéfalo. In: RICKHAM, P. P.; SOPER, R.T.; STAUFFER, U.G. **Cirurgia pediátrica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1989.

SOCCI, D. J. et al. Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. **Experimental Neurology**, v. 155, n. 1, Jan, p. 109-17, 1999.

SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 2, Mar, p. 91-113. 1997.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; GREGOLIN, C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biochimistry Biophys Acta**, v. 839, n. 1, Mar 29, p.62-70. 1985.

VANG, O. et al. What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p.e19881. 2011.

WANG, Q. et al. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. **Brain Research**, v. 958, n. 2, Dec, p.439-447. 2002.

WATERHOUSE, A. L. Wine phenolics. **Annals of New York Academics Science**, v. 957, n., May, p.21-36. 2002.

WELCH K. The intracranial pressure in infants. **Journal of Neurology and surgery**, v. 52. p.693-9. 1980.

WU, Z. et al. Protective effect of resveratrol against kainate-induced temporal lobe epilepsy in rats. **Neurochemistry Research**, v. 34, n. 8, Aug, p.1393-1400. 2009.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. **Methods in Molecular Biology**, v. 108, n., p.101-106. 1998.

YANG, Y. B.; PIAO, Y. J. Effects of resveratrol on secondary damages after acute spinal cord injury in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 7, Jul, p.703-710. 2003.

YAMADA, H.; YOKOTA, A.; FURUTA, A.; HORIE, A. Reconstitution of shunted mantle in experimental hydrocephalus. **Journal of Neurosurgery**, v. 76, n. 5, May, p.856-862. 1992.

YUAN, W.; et al. Anisotropic diffusion properties in infants with hydrocephalus: a diffusion tensor imaging study. **American Journal of Neuroradiology**, v. 30, n. 9, Oct, p.1792-1798. 2009.

ZAARAOUI, W.; et al. Monitoring demyelination and remyelination by magnetization transfer imaging in the mouse brain at 9.4 T. **MAGMA**, v. 21, n. 5, Sep, p.357-362. 2008.

ZHANG, C. et al. Analysis of estrogenic compounds in *Polygonum cuspidatum* by bioassay and high performance liquid chromatography. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, Apr 21, p.223-228. 2006.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Ética em Experimentação Animal

3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 129/2012, sobre o projeto intitulado "*Efeito neuroprotetor do resveratrol na hidrocefalia experimental induzida em ratos Wistar.*", sob a responsabilidade da **Professora Doutora Luiza da Silva Lopes** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** em reunião de 31 de outubro de 2012.

(We certify that the protocol n° 129/2012, about "*Neuroprotective effect of resveratrol in experimental hydrocephalus induced in Wistar rats*", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the College of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo – Ethical Commission of Ethics in Animal Research (CETEA) in 10/31/2012.

Ribeirão Preto, 31 de outubro de 2012.

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética em
Experimentação Animal, em exercício