

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

YANET CHONG JUÁREZ ALLES

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE
HEMORRAGIA SUBEPENDIMÁRIA-INTRAVENTRICULAR
EM RATOS RECÉM-NASCIDOS**

PORTO ALEGRE

2009

YANET CHONG JUÁREZ ALLES

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE
HEMORRAGIA SUBEPENDIMÁRIA-INTRAVENTRICULAR
EM RATOS RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito para obtenção do grau
de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Pediatria e Saúde da
Criança, da Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Jaderson Costa Dacosta

PORTO ALEGRE

2009

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

A434d Alles, Yanet Chong Juárez
Desenvolvimento de um modelo experimental de hemorragia subependimária-intraventricular em ratos recém-nascidos / Yanet Chong Juárez Alles. Porto Alegre: PUCRS, 2009.

ix, 109 f.: il. graf.

Orientação: Prof. Dr. Jaderson Costa DaCosta.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Mestrado em Pediatria e Saúde da criança. Área de Concentração: Neurociências.

1. HEMORRAGIA CEREBRAL. 2. ATIVIDADE MOTORA. 3. COGNIÇÃO.
4. COLAGENASES. 5. MODELOS ANIMAIS. 6. RATOS WISTAR. 7. RECÉM-NASCIDO. 8. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. 9. MATRIZ GERMINATIVA. I. Costa, Jaderson Costa da. II. Título.

C.D.D.616.8

C.D.U. 616.831-005.1:599.323.4-053.31(043.3)

N.L.M. WL 302

YANET CHONG JUÁREZ ALLES

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE
HEMORRAGIA SUBEPENDIMÁRIA-INTRAVENTRICULAR
EM RATOS RECÉM-NASCIDOS**

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito para obtenção do grau
de Mestre pelo Programa de Pós-
Graduação em Pediatria e Saúde da
Criança, da Faculdade de Medicina da
Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

Aprovado em 02 de Março de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antônio Carlos Huff Marrone – PUCRS

Prof. Dr. Humberto Holmer Fiori – PUCRS

Prof. Dr. Matteo Baldisserotto – PUCRS

“O conhecimento da natureza é o caminho para a admiração do Criador.”

Justos Von Liebig (1803-1873)

Dedicatória

*A minha querida mãe por tudo que me ensinou e pelo seu amor (in memoriam).
A meu esposo e companheiro de vida pela sua dedicação, amor, incentivo, carinho e
compreensão.*

A meus filhos pelo amor, carinho, paciência; vocês são nossa inspiração de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por permitir que fosse possível a realização deste mestrado.

Ao meu orientador, professor Jaderson Costa Dacosta, por transmitir seu conhecimento pela ciência, pela sua compreensão e apoio nos momentos difíceis e por esse entusiasmo característico pelo saber científico e por desempenhar um papel importante na minha formação nestes 2 anos de mestrado.

À PUCRS, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança em Pediatria e aos professores pela oportunidade de desenvolver o mestrado. Agradeço ao Professor Dr. Renato Fiori pela oportunidade e sua sempre disposição, sendo referência e modelo a seguir na especialidade de neonatologia.

A todos meus familiares e amigos que sempre me incentivaram. Em especial ao meu esposo Raul Miguel, aos meus filhos Pablo Miguel e Pedro Miguel (que nasceu no transcurso deste trabalho) pela compreensão, carinho e infinita paciência. A minha mãe Susana (que faleceu neste período, e de patologia semelhante a aqui em estudo) e ao meu pai Pan Kwai também *in memoriam*, por tudo que ensinaram e pelo carinho que me deram. Pela ajuda sempre incondicional e carinho de minha irmã Gloria, minha cunhada Marlene e minha sogra Irmgard.

Ao Professor Léder Xavier pela ajuda na parte de histologia.

À Simone Salomoni pela receptividade positiva em todo momento, pela acolhida calorosa, pelo seu entusiasmo e ajuda incondicional com qualquer tipo de problema.

Agradeço ao Samuel meu colega de mestrado, pelo carinho, auxílio técnico e coleguismo na realização desse trabalho. Agradeço também a Simone de Paula que desde o início desta caminhada sempre foi muito amiga e prestativa. A Gianina pelo carinho e ajuda.

Agradeço a Daniela, pelo teu carinho e por sempre estar prestativa para o desenvolvimento desta pesquisa. O Ricardo e Zuzete pela força na resolução de problemas e sempre dispostos para que as coisas realmente funcionassem. A Raquel Mattos agradeço pela

ajuda nos momentos de angústia para ver a parte histológica e pelo teu carinho. Ao Dr. Alexandre Dolganov pela ajuda com a técnica.

A meus colegas de trabalho do Hospital Nossa Senhora da Conceição e do Hospital Mãe de Deus, pela ajuda constante nas trocas de plantões para realização dos experimentos.

Agradeço a Dra. Luciana Friedrich, colega pediatra, pelo auxílio técnico.

A todos os colegas do Neurolab, agradeço pela amizade, pela ajuda, pelo rico ambiente de trabalho e pela contribuição de cada dia para a realização desse trabalho. Agradeço em especial à estagiária Pâmella Nunes.

Ao funcionário Tiago Giuliani pelas dicas na parte de histologia.

Ao professor Martín Cammarota pela possibilidade de utilizar seu laboratório para a execução de parte deste trabalho, pela ajuda em esclarecer dúvidas. A todo o grupo do Centro de Memória, pela ajuda nos testes.

À Nelcy por sua eterna disposição e pelo meu primeiro contato com meu orientador e sua acolhida desde o primeiro momento que conversei a respeito do mestrado.

As secretárias, professores e colegas do Programa de Pós-Graduação De Saúde da Criança em Pediatria pelo convívio, ensinamentos e atendimento sempre atencioso. Em especial a Carla e Ana por sua eterna disposição e entusiasmo nestes dois anos.

Ao Capes pela bolsa e CNPq e a Bauducco pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	13
1 REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 HEMORRAGIA SUBEPENDIMÁRIA-INTRAVENTRICULAR.....	15
1.2.1 Diagnóstico e epidemiologia.....	15
1.2.2 Etiologia	16
1.2.3 Fisiopatologia	17
1.2.4 Estadiamento da hemorragia subependimária-intraventricular	18
1.2.5 Manifestações clínicas.....	18
1.2.6 Diagnóstico.....	19
1.2.7 Correlações clínico-patológicas	20
1.2.7.1 Leucomalácia periventricular	21
1.2.7.2 Papel das citocinas e da cascata inflamatória no desenvolvimento da LPV.....	21
1.2.7.3 O efeito dos corticosteróides no desenvolvimento da lesão cerebral	23
1.2.7.4 Papel dos marcadores bioquímicos no desenvolvimento de injúria cerebral.....	23
1.2.8 Estratégias neuroprotetoras	24
1.2.9 Prognóstico e desfecho	26
1.3 MODELOS ANIMAIS DE HEMORRAGIA INTRACRANIANA.....	27
1.4 DESENVOLVIMENTO DOS VASOS SANGUÍNEOS DO RATO.....	30
1.5 COLAGENASE	32
2 JUSTIFICATIVA	34
2.1 HIPÓTESES ALTERNATIVAS	34

3 OBJETIVOS	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPÍTULO II	46
5 MATERIAIS E MÉTODOS	47
5.1 ETAPAS E ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS.....	47
5.2 DELINEAMENTO	47
5.3 ASPECTOS ÉTICOS	47
5.4 ANIMAIS	48
5.5 FASE I – ESTABELECIMENTO DO MODELO DE HEMORRAGIA SUBEPENDIMÁRIA-INTRAVENTRICULAR.....	48
5.5.1 Estudo piloto	48
5.5.2 Estudo experimental	50
5.6 FASE II – AVALIAÇÃO DA REPERCUSSÃO NEUROMOTORA.....	52
5.6.1 Avaliação comportamental e neuromotora	52
5.6.1.1 Reflexo de endireitamento (<i>surface rigthing</i>)	53
5.6.1.2 Geotaxia negativa (<i>negative geotaxis</i>)	53
5.6.1.3 Teste de ambulação (<i>ambulation</i>).....	54
5.6.1.4 Prensão das patas anteriores (<i>forelimb grip</i>)	54
5.6.2 Avaliações das funções exploratória e cognitivas	55
5.6.2.1 Paradigma de reconhecimento de objetos.....	55
5.6.2.2 Teste do campo aberto	57
5.6.2.3 Teste do cilindro	57
5.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	58
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

CAPÍTULO III	64
Artigo Original.....	65
Introdução	66
Materiais e métodos.....	68
Resultados.....	75
Discussão	78
Referências Bibliográficas.....	81
Legendas	86
Figuras	90
Tabelas.....	106
CAPÍTULO IV	108
7 CONCLUSÕES DETALHADAS	109

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Diagrama de execução do teste piloto para determinar coordenadas no método de <i>freehand</i>	49
FIGURA 2 – Diagrama de teste piloto para determinar a concentração ideal para provocar hemorragia subependimária-intraventricular.....	50
FIGURA 3 – Diagrama do protocolo experimental.....	51
FIGURA 4 – Técnica de <i>freehand</i> para indução de hemorragia subependimária-intraventricular.....	52
FIGURA 5 – O reflexo de endireitamento (<i>surface rigthing</i>).....	53
FIGURA 6 – Geotaxia negativa (<i>negative geotaxis</i>)..	54
FIGURA 7 – Teste de ambulação (<i>ambulation</i>).....	54
FIGURA 8 – Preensão das patas anteriores (<i>forelimb grip</i>).	55
FIGURA 9 – Teste de reconhecimento de objetos.	56
FIGURA 10 – Teste do campo aberto	57
FIGURA 11 – Teste do cilindro	58
FIGURA 12 – Grid de pontos.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área da secção
A/p	Área ponto
cm	Centímetros
C	Colagenase
CN	Controle negativo
Cols.	Colaboradores
g	Gramma
h	Hora
HIV	Hemorragia intraventricular
HPIV	Hemorragia peri-intraventricular
HS-HIV	Hemorragia subependimária-intraventricular
IG	Idade gestacional
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina 10
ip	Intraperitoneal
LPV	Leucomalácia periventricular
MB	Membrana basal
MP	Membrana plasmática
MMPs	Metaloproteínas da matriz
MP	Membrana plasmática
mg/mL	Miligramas/mililitro
mL	Mililitros
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
min	Minutos
mm	Milímetros
mm²	Milímetros quadrados
mmHg	Milímetros de mercúrio

PC	Paralisia cerebral
pg/mL	Picogramas/ mililitros
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
RM	Ressonância magnética
RN	Recém-nascido
RUPREMA	Ruptura prematura de membranas
SEM	Erro padrão
SNC	Sistema nervoso central
SF	Soro fisiológico
ΣP	Somatório de pontos
T	Distância entre as secções
TC	Tomografia computadorizada
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidade Internacionais
US	Ultra-sonografia
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

RESUMO

Introdução: A hemorragia subependimária-intraventricular, também chamada de hemorragia da matriz germinativa, ocorre, em pré-termos com menos de 34 semanas e/ou abaixo de 1500 gramas. O desenvolvimento de modelos para entender a evolução da lesão cerebral antes e depois da hemorragia é importante para determinar estratégias de tratamento da doença.

Objetivo: desenvolver um modelo experimental neonatal de hemorragia subependimária-intraventricular em ratos recém-nascidos, através da colagenase tipo VII e avaliar os desfechos da lesão através de testes neuromotores, cognitivos e avaliação macroscópica e microscópica dos subgrupos: controle negativo, grupo salina e colagenase.

Método: Ratos *Wistar* no P6 foram submetidos à hemorragia pela técnica da mão livre (*freehand*) através de uma injeção intracraniana com colagenase tipo VII. Num grupo foi provocada hemorragia unilateral, e, em outro, hemorragia bilateral. Os mesmos foram avaliados com testes neuromotores e cognitivos (P7, P11, P15 e P30). Após os testes neuromotores e cognitivos, foram realizadas as avaliações macroscópicas e histológicas. Um grupo de animais também foi avaliado histologicamente no P7 após a lesão hemorrágica.

Resultados: Foi possível provocar lesão na matriz germinativa com colagenase tipo VII, sendo fácil de reproduzir. As alterações neuromotoras, como ambulação, geotaxia negativa, reflexo de endireitamento e o teste de preensão das patas anteriores apresentaram valores significativos na fase aguda. Já o teste do cilindro e o reconhecimento de objeto não foram estatisticamente significativos. O teste do campo aberto foi significativo para o grupo com hemorragia bilateral. Encontramos diminuição do volume do encéfalo e lesão da matriz germinativa na avaliação histológica.

Conclusão: O modelo de hemorragia subependimária-intraventricular em ratos *Wistar* recém-nascidos (P6) foi estabelecida utilizando a colagenase tipo VII, sendo de fácil execução. Não houve diferença significativa na avaliação cognitiva e as alterações neuromotoras são notáveis na fase aguda. A avaliação histológica evidenciou alterações semelhantes às do humano. Houve redução do volume do encéfalo na região do hemisfério correspondente à lesão.

Descritores: hemorragia cerebral, atividade motora, cognição, colagenases, modelos animais, ratos *Wistar*, recém-nascido, experimentação animal, matriz germinativa.

ABSTRACT

Introduction: Hemorrhage subependymal layer/intraventricular, also called the germinal matrix hemorrhage occurs in premature infants with less than 34 weeks and 1500 grams or below. The development of models for understanding the evolution of brain damage before and after the hemorrhage is important to determine strategies for treatment of disease.

Objective: Developing a neonatal experimental model of hemorrhage subependymal layer-intraventricular in newborn rats by collagenase type VII and evaluate the outcomes of the injury through neuromotor tests, cognitive test, and macroscopic and microscopic evaluation of subgroups: negative control, saline group and collagenase.

Method: Rats were subjected to the P6 hemorrhage by free hand technique (*freehand*) through an injection with intracranial collagenase type VII; one group caused a unilateral hemorrhage in another bilateral hemorrhage. They were evaluated with neuromotor and cognitive tests in P7, P11, P15 and P30. After the neuromotor and cognitive test, macroscopic and histological examinations were performed. A group of animals also were evaluated histologically in P7 hemorrhage after injury.

Results: It was possible to cause injury to the germinal matrix with collagenase type VII, and easy to play. Neuromotor changes as ambulation; negative geotaxis, surface righting, and forelimb grip have a significant value in the acute phase. But the test of the cylinder and the test of recognition of objects were not statistically significant. The test of the open field was significant, for the group with bilateral hemorrhage. We found decrease in the volume of encephalon and the germinal matrix lesion in histological evaluation.

Conclusion: The model of hemorrhage subependymal layer/intraventricular in newborn rats (P6) was established using the collagenase type VII, and easy to implement. There was no significant difference in cognitive evaluation and the neuromotor changes are remarkable in the acute phase. Histological evaluation showed changes similar to those of humans. Reduction in the volume of the encephalon in the hemisphere corresponding to the lesion.

Key words: cerebral hemorrhage, motor activity, cognition, collagenase, animal models, Wistar rats, newborn, animal testing, germinal matrix.

CAPÍTULO I

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 INTRODUÇÃO

A hemorragia periventricular ou subependimária, também chamada de hemorragia da matriz germinativa, ocorre em 40-50% dos recém-nascidos (RNs) com menos de 26 semanas e aproximadamente em 20% entre os RNs de 26-34 semanas de gestação¹⁻³. Em alguns estudos descritos na literatura, quando relacionada com o peso, a hemorragia intracraniana ocorre em 20%-40% dos recém-nascidos abaixo de 1500 gramas (g), sendo menos comum em RNs a termo. O sangramento dentro do crânio pode acontecer em nível extracerebral (dentro dos espaços epidural, subdural ou subaracnóideo), no parênquima cerebral ou cerebelar, ou, ainda, dentro dos ventrículos, a partir da matriz germinativa subependimária ou do plexo coróide. Há variações quanto à incidência, patogenia e prognóstico, conforme a localização⁴.

Aproximadamente 2% do total de nascimentos são de pré-termos menores de 31 semanas de idade gestacional (IG). Devido aos grandes avanços nas últimas décadas da assistência perinatal houve uma redução na mortalidade neonatal. Estima-se que, na América Latina, a taxa de sobrevivência nos recém-nascidos com peso ao nascer abaixo de 1500 g é de 73%⁵.

A hemorragia subependimária-intraventricular (HS-HIV) é a causa mais frequente de hemorragia intracraniana entre a população de pré-termos⁴. Este tipo de sangramento, que se origina na matriz germinativa subependimária, é uma complicação comum da prematuridade, estando associada a altas taxas de mortalidade, podendo evoluir para hidrocefalia pós-hemorrágica e sequelas neurológicas severas⁶. Sua incidência tem diminuído nos últimos 5-10 anos, de modo que a grande maioria dos centros terciários relata uma incidência que varia de 17-25% e 15% nos países desenvolvidos. Nas unidades neonatais brasileiras, a incidência média em 1999 foi de 26%, variando de 13% a 46% nos recém-nascidos de muito baixo peso⁷. Nas unidades da Rede Gaúcha de Neonatologia, a incidência em 2006 foi de 21% (sendo 40,4% para hemorragia grau I, 16,8% para hemorragia grau II, 20,6% para hemorragia grau III e 22,1% hemorragia grau IV), dados obtidos da Rede Gaúcha de Neonatologia da Sociedade de Pediatria do Rio Grande do Sul.

A taxa de mortalidade dos recém-nascidos com hemorragia intracraniana no período neonatal depende do grau de hemorragia^{3,8}. O dado de mortalidade obtido pela Rede Gaúcha

de Neonatologia em 2006, de acordo com o peso, foi de 84,1% com menos de 750 g; 55,8% entre 751-1000 g; 23% entre 1001-1250 g e 12,9% entre 1251-1500 g.

A caracterização das hemorragias no período neonatal em recém-nascidos pré-termo constitui um evento importante para a prevenção de sequelas em curto e longo prazo. A evolução a longo prazo dos neonatos portadores de hemorragia intracraniana é preocupante do ponto de vista neurológico. Os graus mais avançados de hemorragia estão associados à ocorrência de sequelas motoras, em especial à hemiparesia espástica, e de sequelas cognitivas por diminuição do número de axônios, dendritos, neurônios, mielina e sinapses, tendo como resultado a limitação do desenvolvimento destas crianças, através de deterioração intelectual, convulsões, cegueira e surdez^{9, 10}. Em alguns estudos longitudinais, no período da idade escolar, são destacadas dificuldades de aprendizagem, alterações de comportamento e alterações em mecanismos adaptativos sociais¹¹. O risco elevado de adoecer e falecer durante o primeiro ano de vida e os efeitos do baixo peso ao nascer que se estendem ao crescimento e desenvolvimento infantil exigem a assistência intensiva de um grupo de atendimento multidisciplinar¹². Ohlweiler e colaboradores (cols.) encontraram um atraso significativo no desenvolvimento neuropsicomotor entre o grupo de pré-terms com hemorragia intracraniana quando comparando a crianças prematuras sem alterações neurológicas¹³, estando a hemorragia associada a retardo mental e hidrocefalia.

Atualmente, na busca de métodos para o reparo de problemas hemorrágicos cerebrais, a necessidade de entender sua patogenia e o comportamento das lesões têm impulsionado maiores investigações através de modelos experimentais. Existem modelos de hemorragia intracraniana em ratos adultos e em outros animais, como cães, ovelhas, macacos, gatos, com hemorragia da matriz germinativa. Através de um estudo experimental de hemorragia subependimária, hipotetizamos que a utilização de colagenase como causador da hemorragia possa servir de modelo para futuras descobertas terapêuticas e acompanhamento das lesões.

1.2 HEMORRAGIA SUBEPENDIMÁRIA-INTRAVENTRICULAR

1.2.1 Diagnóstico e epidemiologia

A hemorragia intraventricular (HIV) origina-se na matriz germinativa subependimária, com entrada subsequente de sangue no sistema ventricular. Este é um distúrbio predominantemente dos pré-terms. A hemorragia é considerada precoce se ocorre antes das

72 horas (h) de vida e tardia quando ocorre após 72 h de vida. Os RNs têm, geralmente, menos de 34 semanas e menos de 1500 g de peso de nascimento, sendo esta patologia inversamente proporcional à IG. O chamado período de risco ocorre durante os 3- 4 dias após o nascimento; 50% das hemorragias ocorrem nas primeiras 6-12 h de vida, 75% até o segundo dia e 90% até o terceiro dia de vida. Entre os RNs com hemorragia precoce, 10-65% deles apresentarão progressão da hemorragia, com extensão máxima ocorrendo dentro de 3 a 5 dias do diagnóstico inicial ^{3, 8, 14}.

1.2.2 Etiologia

Alguns fatores intra ou extravasculares podem contribuir para a patogenia da hemorragia periventricular ^{3, 15}.

- Fatores intravasculares:
 - Distúrbios plaquetários e de coagulação;
 - Hipotensão arterial com diminuição do fluxo sanguíneo cerebral seguido de reperfusão;
 - Aumento da pressão venosa cerebral (trabalho de parto, parto vaginal);
 - Distúrbios respiratórios;
 - Aumento do fluxo sanguíneo cerebral: hipertensão (sono REM, atividade motora, aspiração endotraqueal, instalação de midriáticos, pneumotórax, infusão de colóides, convulsões); expansão rápida de volume; hipercapnia; queda do hematócrito; hipoglicemia;
 - Flutuação do fluxo sanguíneo cerebral: pacientes ventilados em assincronia com o respirador.
 - Fatores vasculares:
 - Fragilidade capilar; vulnerabilidade dos capilares à lesão hipóxico-isquêmica
 - Fatores extravasculares:
 - Deficiente suporte vascular; aumento da atividade fibrinolítica.
-

1.2.3 Fisiopatologia

Nos pré-termos, o principal local de sangramento é a matriz germinativa, um sítio de proliferação neuronal e origem do tecido de sustentação cerebral, constituído por uma população celular com metabolismo bastante ativo e fonte de neuroblastos. A matriz germinativa inicia sua formação a partir da 12^a a 16^a semana de gestação, servindo como precursor neuronal por volta da 10^a a 20^a semana de gestação. No terceiro trimestre a matriz germinativa também origina glioblastos, que serão posteriormente diferenciados em oligodendroglia e astrócitos. A matriz germinativa regride de uma largura de 2,5 milímetros (mm) entre 23 a 24 semanas a 1,4 mm com 32 semanas, envolvendo completamente por volta de 36 semanas, no sentido póstero-anterior^{16,17}.

Esta matriz consiste em uma área gelatinosa que contém uma rede vascular destituída de suporte de estroma e cujos vasos possuem somente uma camada de endotélio, sem musculatura lisa, elastina ou colágeno. Localiza-se ventro-lateralmente ao ventrículo lateral, entre o núcleo caudado e o tálamo, no mesmo nível ou levemente posterior ao forame de Monro. Quando comparada ao córtex, sua irrigação sanguínea é abundante, sendo realizada principalmente pela artéria de Heubner (ramo da artéria cerebral anterior) e pelas artérias estriadas laterais que se originam da artéria cerebral média. Estas artérias alimentam uma rede capilar constituída por vasos irregulares envoltos de endotélio que não têm características de arteríolas ou vênulas. É um tecido vascular imaturo que se remodela a capilares definitivos uma vez que a matriz germinativa desaparece. O sistema venoso é constituído por três veias (coroidal, talâmica e talamoestriada), que formam a veia cerebral interna convergindo próximo ao núcleo caudado à altura do forame de Monro. Essa veia dirige-se à grande veia de Galeno, estando propício à congestão venosa, sendo este o ponto onde o fluxo sanguíneo muda de trajeto, com posterior aumento da pressão da região e ruptura dos capilares¹⁷⁻²⁰. Logo após, o hematoma é substituído por formações císticas cerebrais, o que provoca destruição de precursores gliais e danos para o cérebro em desenvolvimento. A hemorragia pode permanecer circunscrita a este nível (80%) ou drenar para as cavidades ventriculares, de onde se estende aos ventrículos e cisterna da base na fossa posterior. Um achado característico é a presença de coágulo nos cornos occipitais dos ventrículos laterais, cuja destruição leva a infarto hemorrágico periintraventricular e hidrocefalia^{3,4,17,21}.

Têm sido postulados os seguintes mecanismos na hemorragia periventricular do recém-nascido pré-termo: (1) a hipóxia-isquemia pode preceder a hemorragia, sendo a leucomalácia periventricular (LPV) um subtipo de necrose neuronal; (2) a pressão

intracraniana pode aumentar de forma aguda, com uma maciça hemorragia intraventricular, e chegar a comprometer a perfusão cerebral; (3) a matriz germinativa e os precursores gliais são destruídos, ocasionando perda da futura oligodendroglia, o que pode afetar a mielinização; (4) a substância branca periventricular é destruída; (5) acontece vasoespasmo com isquemia focal; (6) ocorre hidrocefalia pós-hemorragica ^{17, 21, 22}.

1.2.4 Estadiamento da hemorragia subependimária-intraventricular

Existem vários estadiamentos da hemorragia da matriz germinativa, sendo o mais aceito o desenvolvido por Papile ²³:

- Grau I: hemorragia subependimária;
- Grau II: hemorragia intraventricular sem dilatação;
- Grau III: hemorragia intraventricular com dilatação;
- Grau IV: hemorragia intraventricular com hemorragia parenquimatosa.

Existe outro estadiamento, desenvolvido por Volpe ²¹:

- I. Hemorragia da matriz germinativa ou menos do que 10% de sangue no ventrículo lateral em corte parasagital;
- II. Hemorragia intraventricular com 10-50% de sangue nos ventrículos, em corte parasagital;
- III. Hemorragia intraventricular com mais de 50% de sangue no ventrículo lateral, em corte parasagital.

1.2.5 Manifestações clínicas

Na maioria das vezes, o quadro é assintomático ou inespecífico e os sinais e sintomas dependem da velocidade de instalação da hemorragia, do tamanho, do local e de sua evolução. Os sinais e sintomas clínicos podem acontecer como resultado da perda de volume sanguíneo ou da disfunção neurológica. Nenhum sinal é específico e este depende em parte de quão rápida é a perda de sangue. Podem-se caracterizar três síndromes clínicas distintas ³;

-
- Catastrófica: deterioração neurológica rápida, com índice de mortalidade elevado (50-60%) e sequelas graves a longo prazo nos sobreviventes. Sua evolução ocorre em minutos (min) ou horas com estupor, coma profundo, hipoventilação ou apnéia, convulsão generalizada tônica, rigidez pupilar, postura em descerebração, quadriparesia flácida e olhos fixos à estimulação vestibular. Os sinais clínicos são abaulamento da fontanela anterior, hipotensão, bradicardia, instabilidade térmica, acidose metabólica e alteração do controle glicêmico.
 - Saltatória: hemorragias menos extensas, alternando períodos de normalidade com piora do quadro, instalando-se em horas ou dias. Ocorrem alterações no nível de consciência, hipotonia, alteração na posição e movimento dos olhos, diminuição da quantidade e qualidade da motricidade espontânea e ângulo poplíteo em extensão.
 - Silenciosa: é diagnosticada por exames radiológicos de rotina. É a síndrome mais frequente, responsável por 50-60% dos sangramentos em RNs pré-termo menores de 1500 g. Os sinais são discretos e o achado clínico mais importante é a queda do hematócrito de forma inexplicada.

1.2.6 Diagnóstico

A ultra-sonografia transfontanelar (UST) é o método de escolha para o diagnóstico de hemorragia, pois apresenta baixo custo, boa sensibilidade e especificidade. Indica-se a realização de UST nas primeiras 72 h de vida^{21,24}.

A tomografia computadorizada (TC) de crânio é eficaz para demonstrar o local e a extensão da hemorragia. De um modo geral, a TC é reservada para a identificação de outras variedades de hemorragias intracranianas, como o hematoma subdural e o epidural da fossa posterior e para elucidação de lesões parenquimatosas mais periféricas^{3,21}.

A ressonância magnética (RM) fornece excelentes imagens, mas é dispendiosa e requer o transporte do paciente para sua realização, o que torna a sua realização de rotina pouco viável em nosso meio. Está indicada nos casos de hemorragia grave e durante o acompanhamento neurológico do paciente na primeira infância²¹.

Todo recém-nascido com IG igual ou menor de 32 semanas com peso de nascimento inferior a 1500 g deve ser submetido à UST nos primeiros 3-5 dias de vida, devendo esta ser repetida com 7 dias de vida e com um mês nos casos normais. Nos casos de alterações deve-se repetir semanalmente para diagnóstico da hidrocefalia pós-hemorrágica²⁵.

1.2.7 Correlações clínico-patológicas

A presença, severidade e distribuição das lesões neuropatológicas originárias da hemorragia da matriz germinativa dependem de diversos fatores, incluindo a natureza e a duração do insulto, a IG do feto ou RN e a presença ou ausência de estresse sistêmico. Fatores vasculares e metabólicos apresentam um papel crítico, considerando que áreas específicas do desenvolvimento cerebral são especialmente sensíveis a mudanças de qualquer natureza^{21, 26, 27}. As regiões periventriculares dos hemisférios cerebrais são compostas pelo núcleo profundo e pelas fibras do centro semi-oval. O desenvolvimento desta região é importante para as conexões cerebrais e para o tamanho dos ventrículos. O sistema límbico, o sistema visual, o sistema auditivo, o motor primário e o sistema somatossensorial são todos dependentes da integridade destas conexões. Lesões que ocorrem nesta área cerebral do recém-nascido são geralmente destrutivas, havendo assim uma dilatação ventricular para compensar a perda tecidual. Com o avançar da IG há aumento do peso cerebral, estando este relacionado ao número de neurônios, de células gliais, de vasos e ao desenvolvimento da arborização dendrítica e da mielina. Com a maturação haverá mudanças histológicas nesta área: a densidade e a variabilidade das células diminuem; ocorre a formação da mielina e os vasos amadurecem. A mielinização começa no segundo trimestre de gestação e continua até a vida adulta, mas a maior parte ocorre logo após o nascimento. No 3º ao 5º mês de gestação há uma migração neuronal das zonas ventricular e subventricular, tendo como guia as células gliais radiais; sendo o mecanismo para a formação do córtex e de estruturas nucleares profundas. Já por volta da 20ª à 24ª semana de gestação, o córtex cerebral tem essencialmente o número completo de neurônios^{21, 28-30}.

As grandes manifestações neurológicas da lesão cerebral são os déficits motores espásticos, principalmente a hemiparesia e a quadriparesia. Os déficits intelectuais são comuns. No entanto, as deficiências mais frequentes envolvem o sistema motor, ocorrendo manifestações em tônus, postura, choro, reflexos e movimentos espontâneos. Axônios do sistema visual ou auditivo podem estar envolvidos e produzir distúrbios na recepção cortical de som e luz (testes de respostas corticais evocados)^{29, 31}.

1.2.7.1 Leucomalácia periventricular

A LPV refere-se à necrose da substância branca, com uma distribuição característica: substância branca dorsal e lateral aos ângulos externos dos ventrículos laterais, envolvendo o centro semioval e as radiações óticas e acústicas. A LPV ocorre em 7-26% dos prematuros com peso de nascimento inferior a 1500 g³². Sua incidência varia conforme a gravidade da hemorragia e é maior à medida que diminui a taxa de mortalidade dos RNs prematuros de muito baixo peso. A maior seqüela a longo prazo da LPV é a displegia espástica, o maior déficit motor no recém-nascido pré-termo, caracterizado por uma paresia espástica que afeta principalmente membros inferiores. A necrose pode ser periventricular focal ou difusa na substância branca. A evolução caracteriza-se por necrose de coagulação (5-8 h após a lesão). Após alguns dias, astrócitos, micróglia (24-48 h) e macrófagos (5 dias) enchem a periferia da necrose. O centro da área pode liquefazer, resultando em pequenas cavidades sem comunicação com os ventrículos (3 semanas). Na lesão difusa, há perda de oligodentrócitos com substituição por astrócitos, levando à deficiente mielinização com diminuição do volume da substância branca, com aumento do tamanho ventricular^{21, 23, 33, 34}. A dilatação dos ventrículos é uma complicação freqüente devido provavelmente ao comprometimento da reabsorção do liquor, em função da obstrução dos forames de Luschka e Magendie³⁵. Já quando acontece hemorragia no parênquima cerebral, envolve a substância branca periventricular, podendo desenvolver-se cisto porencefálico no local da hemorragia. Alguns estudos apontam o infarto venoso como achado neuropatológico; o hematoma da matriz germinativa causa obstrução ao fluxo sanguíneo venoso, e a pressão intraventricular elevada libera substâncias vasoconstritoras no local, ambas situações promovendo isquemia cerebral³⁶.

1.2.7.2 Papel das citocinas e da cascata inflamatória no desenvolvimento da LPV

A patogênese da leucoencefalopatia cerebral está implicada nas diversas condições inflamatórias e infecciosas perinatais. A via inflamatória, mediada pela citocinas, está envolvida com a morte da célula nervosa, via apoptose neuronal³⁷. As citocinas são polipeptídios de baixo peso molecular, produzidas por uma variedade de células e comunicam-se com uma variedade de células-alvo, via receptores de superfície na célula. Algumas citocinas são consideradas antiinflamatórias e outras aumentam a inflamação, sendo

consideradas pró-inflamatórias. Assim, as pró-inflamatórias induzem a degeneração da mielina e a apoptose oligodendrócita, exercendo também efeitos na maturação dos precursores dos oligodendrócitos, pela inibição da sua diferenciação, explicando assim a hipomielinização nos cérebros dos recém-nascidos com lesão na substância branca^{31, 38, 39}. As citocinas pró-inflamatórias descritas na infecção intra-uterina são fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8). A IL-6 é o mediador mais conhecido, após uma invasão bacteriana. A IL-6 é sintetizada por monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos em resposta a outros mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β . Esta também é sintetizada dentro dos neurônios e da neuroglia, apresentando efeitos neuroprotetores e neutróficos^{39, 40}.

As IL-6, IL-1 β e TNF- α induzem à expressão de moléculas de adesão, como a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), dentro do SNC, tanto no parênquima como no endotélio vascular, podendo comprometer a ativação da micróglia e levar à desmielinização⁴¹.

Na lesão oligodendroglial, as citocinas são de grande importância. Yoon e cols. encontraram aumento das citocinas no líquido amniótico, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , em recém-nascidos pré-termo, com lesão na substância branca. Logo, a inflamação intra-amniótica e a resposta inflamatória fetal sistêmica (funisite) foram associadas ao desenvolvimento de paralisia cerebral, com três anos de idade^{42, 43}. Yoon e cols. avaliaram também o nível de IL-6 na cérvix uterina de pacientes com RUPREMA (ruptura prematura de membranas) e observou que IL-6 na secreção cervical tem excelente valor diagnóstico para corioamnionite e valor prognóstico para complicações infecciosas no período neonatal com níveis de IL-6 acima de 350 picogramas/mililitros (pg/mL)⁴⁴.

Perlman e cols. (1996) relatam que a RUPREMA e a corioamnionite foram preditoras de leucomalácia⁴⁵. Já o estudo de Kumazaki (2002) apresenta a hipótese de que outros fatores adicionais além da corioamnionite possam participar na gênese da doença. Assim, possivelmente distúrbios na circulação placentária possam também contribuir para o desenvolvimento da leucomalácia^{46, 47}.

Spinillo e cols. relataram que RNs de mães com IG entre 24-34 semanas e com RUPREMA, têm 5,75 vezes mais chance de ter uma deficiência neurocomportamental severa⁴⁸. Há inclusive significativa relação entre a duração da ruptura de membranas e a ocorrência de hemorragia intraventricular severa, LPV cística e deficiência neurocomportamental moderada a severa^{49, 50}.

1.2.7.3 O efeito dos corticosteróides no desenvolvimento da lesão cerebral

Os corticóides em excesso podem exercer efeito deletério no cérebro em desenvolvimento. Sua exposição frequente, no período fetal, atrasa a mielinização dos axônios óticos, podendo levar a uma redução do volume do hipocampo em 30%³³. No entanto, a administração de corticóide, especificamente a betametasona endovenosa antenatal, parece eficaz em reduzir a incidência de hemorragia peri-intraventricular (HPIV), pois parece acelerar a maturação da região da matriz germinativa e melhora a perfusão cerebral por aumentar a pressão arterial sistêmica, tendo também relação com casos menos graves de doença da membrana hialina (DMH)⁵¹⁻⁵³. Baud e cols. compararam o uso de dois corticóides, a dexametasona *versus* betametasona, e observaram uma incidência de leucomalácia de 11% com a dexametasona *versus* 4,4% com a betametasona, sendo a incidência nos controles de 8,4%⁵²⁻⁵⁵. A utilização de um único curso de corticóide é recomendado para todas as gestantes entre 24-34 semanas em trabalho de parto prematuro²⁵.

1.2.7.4 Papel dos marcadores bioquímicos no desenvolvimento de injúria cerebral

Uma excessiva atividade fibrinolítica tem sido encontrada na região da matriz germinativa de pré-termos^{56,57}. A pré-estimulação do sistema imune por lipopolisacaridase é associada com a severidade do quadro da injúria cerebral, como demonstrado num estudo com a injeção de sangue em camundongos^{58,59}. A hemorragia intracerebral é acompanhada por um aumento dos níveis de determinados marcadores bioquímicos no soro. A intensidade do edema e o volume do hematoma estão correlacionados com os níveis séricos de glutamato, IL-6, TNF- α e VCAM-1. Níveis séricos elevados de glutamato associam-se a pobres resultados neurológicos. Metaloproteinases da matriz (MMPs) são também elevadas no soro em pacientes com hemorragia intracraniana. O início do hematoma, após a hemorragia intracraniana está correlacionado a altos níveis séricos de IL-6, TNF- α , MMPs. As observações acima sugerem que a determinação de alguns marcadores séricos pode tornar-se uma ferramenta importante para a previsão do resultado da hemorragia intracraniana em RNs⁶⁰.

Protrombina e plasminogênio são os precursores da trombina e plasmina no plasma. *In vitro* a trombina induz apoptose, causando mudanças morfológicas nos astrócitos e causando neurite em cultura de neurônios, provavelmente através da ativação de receptores de

proteases. Em cérebros de roedores adultos, a injeção de trombina causa edema cerebral, talvez pela digestão da vasculatura básica da membrana basal, bem como por inflamação, necrose cerebral e apoptose. A plasmina é produzida após a divisão do plasminogênio por uma enzima ativadora do plasminogênio: a uroquinase. A injeção de plasmina também pode ocasionar edema, inflamação e morte das células do cérebro. Neurônios e glias são capazes de expressar receptores de trombina, os quais são mais abundantes no período neonatal. Há também inibidores endovenosos de plasmina e trombina. Existem inibidores da ativação da plasminogênese, alfa 2-macroglobulina e protease nexina-1 que estão presentes no desenvolvimento do cérebro imaturo, em concentrações maiores do que no cérebro maduro^{59, 61}.

1.2.8 Estratégias neuroprotetoras

As estratégias preventivas envolvem os cuidados pré-natais e perinatais, com o propósito de ter uma sobrevivência de qualidade e evitar o número de partos prematuros. Assim, a transferência das gestantes com doenças associadas à prematuridade antes do nascimento, diminui a hemorragia intracraniana, pois sabe-se que a sua ocorrência é três vezes maior nos neonatos quando estes são transportados após o nascimento. Além disso, é importante oferecer assistência ao trabalho de parto prematuro, além de um adequado manejo da gestação de alto risco⁶²⁻⁶⁵.

É necessário prover cuidados específicos na reanimação neonatal: evitar o uso de expansões rápidas de volumes e de soluções hipertônicas; bem como administrar ventilação cuidadosa sem hiperventilação, visto que esta pode causar hipóxia e hipocapnia e, assim, alterar a auto-regulação do fluxo cerebral. Além disto, deve-se fazer a correção e prevenção de distúrbios ventilatórios, hemodinâmicos e de coagulação⁶⁶.

Alguns estudos sugerem que a dor e o estresse levam a flutuações do fluxo sanguíneo, podendo propiciar o aparecimento de hemorragia intracraniana. Deve-se, então, adotar protocolos de manipulação mínima e reduzir o excesso de ruído e luminosidade^{67, 68}.

A administração de vitamina E, um antioxidante, é controversa como medida profilática para diminuir a hemorragia intracraniana, devido aos seus efeitos adversos, que incluem sepse e enterocolite necrosante³.

Alguns estudos sugerem que o sulfato de magnésio administrado no período antenatal possa diminuir o risco de paralisia cerebral (PC) e de HPIV. Seu mecanismo ainda não está

totalmente elucidado, podendo ser devido a seus efeitos antioxidantes e ou vasculares (a inibição da síntese do óxido nítrico diminui a formação de radicais livres na isquemia neuronal; no entanto, esta inibição pode comprometer as funções vasoregulatorias mediadas pelo óxido nítrico, levando a distúrbios na resposta à hipoxemia)^{17, 67}.

A administração de fenobarbital à gestante em risco de parto prematuro poderia promover um efeito protetor ao cérebro deste neonato prevenindo, desta forma, variações da pressão de perfusão cerebral. Outros estudos clínicos sugerem que esta não é uma medida conclusiva, podendo, piorar a hemorragia. Atualmente, esta prática restringe-se àqueles recém-nascidos que evoluem com convulsões⁶⁹.

A indometacina tem sido utilizada profilaticamente nas primeiras 24 h dos RNs prematuros de baixo peso (indicada nos prematuros abaixo de 1250 g e em ventilação mecânica), reduzindo a incidência de HPIV grave (graus III e IV) e também propiciando o fechamento do canal arterial. Esta medicação inibe a formação de radicais livres pelo endotélio lesado da matriz germinativa e acelerar a maturação vascular na região da matriz germinativa. Em modelos animais, a indometacina diminui o fluxo sanguíneo cerebral basal e atenua a vasodilatação provocada pelos episódios de hipóxia e/ou hipercapnia, com redução nos níveis séricos de prostaglandinas e maturação da microvasculatura da matriz germinativa^{70, 71}. Dentre os efeitos, pode diminuir o fluxo para outros órgãos e até mesmo perder seu mecanismo de proteção cerebral frente a episódios de hipóxia. Schmidt e cols. 2001 avaliaram o uso de indometacina profilática (antes das 24 h de vida) e concluíram que o uso da mesma diminui significativamente a incidência de formas graves de hemorragia intracraniana⁷². No entanto, o seguimento destas crianças não demonstrou redução da incidência de paralisia cerebral (PC), ou melhor, desenvolvimento cognitivo, no grupo que usou a indometacina⁷³⁻⁷⁵.

O ethamsilato inibe a síntese de prostaglandinas, através da polimerização do ácido hialurônico da membrana basal dos capilares, e promove a adesão plaquetária, prevenindo o sangramento dos capilares da matriz germinativa. No ensaio europeu com 334 prematuros não se demonstrou redução da incidência de hemorragia ou hidrocefalia pós-hemorragica entre o grupo tratado⁷⁶.

As citocinas inflamatórias exercem um papel importante na lesão da substância branca. Há evidências que RNs que faleceram por lesões da substância branca tinham níveis de citocinas inflamatórias maiores em relação aos que não tinham lesão. Portanto, a administração de citocinas antiinflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10), que regula para menos a produção das citocinas pró-inflamatórias, IL1 β e o TNF- α , pode prover

neuroproteção, tanto antes como após instalada a lesão já que alguns componentes da ativação inflamatória persistem por dias^{3,24}.

O corticóide pré-natal (importante inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias) reduziu o risco de PC, com hemiplegias e quadriplegias espásticas, no estudo prospectivo de Cooke⁷⁷. Canterino e cols. na sua análise retrospectiva, concluíram que o uso de corticóide pré-natal foi associado com uma probabilidade 56% menor para leucomalácia, com HPIV, e 58% menor para leucomalácia isolada⁷⁸. Leviton e cols. relataram diminuição da HPIV, nos RNs abaixo de 29 semanas, em 40-50%^{79, 80}. Assim, a corticoterapia pré-natal está relacionada com a redução de HPIV grave porque acelera a maturação da região da matriz germinativa, aumenta a pressão sistêmica, melhorando o fluxo cerebral⁵¹. Logo recomenda-se o uso de um único curso de corticóide entre 24-34 semanas de IG porque reduz a DMH, a hemorragia cerebral e a mortalidade neonatal^{65 25}.

1.2.9 Prognóstico e desfecho

O desfecho a curto prazo é relacionado à gravidade da hemorragia, com uma taxa de mortalidade de 5-10% e 5-20% respectivamente para hemorragia leve a moderada. Para hemorragia grave é de 50-80% (HIV grau IV). Os déficits motores relacionam-se com a topografia da hemorragia, manifestando-se como hemiparesia espástica ou quadriparesia espástica assimétrica. Os prejuízos visuais podem resultar da ventriculomegalia ou da perda da substância branca cerebral, de forma extensa, com envolvimento do córtex estriado e paraestriado^{81,82}.

As crianças com risco elevado para hemorragia devem ser avaliadas periodicamente até a idade escolar, pois alguns estudos mostram grau de deficiências, em crianças com 5-8 anos de idade^{50,83}.

Conclui-se que alguns estudos demonstram que RNs pré-termo de muito baixo peso evidenciaram problemas neurocomportamentais na ausência de PC em 30-50% e destes 25-30% apresentaram desordens psiquiátricas na adolescência, como autismo, hiperatividade, esquizofrenia e déficit de atenção^{84,85}. A hemorragia unilateral pode desenvolver hemiparesia espástica, em membros superiores e inferiores, com atraso cognitivo leve. A quadriparesia e o déficit cognitivo significativo são observados na hemorragia cerebral muito extensa e bilateral, ou quando ocorre associado à LPV⁸⁶. A hidrocefalia pós-hemorrágica é a

complicação determinante das morbidades neurológicas que podemos observar no pré-termo com menos de 1500 g.

1.3 MODELOS ANIMAIS DE HEMORRAGIA INTRACRANIANA

Estudos experimentais em modelo animal objetivam conhecer os mecanismos da injúria e fornecer um método no qual se testem medidas terapêuticas. Para entender os fatores e a patogênese subsequente do dano cerebral, devido a uma hemorragia intracraniana, torna-se necessário avaliar alguns modelos de hemorragia em animais, para prevenir ou realizar o tratamento da mesma ^{4, 87}.

Existe um número de espécies de animais que são utilizados para avaliar terapias ou a fisiopatologia da hemorragia, que incluem roedores, cães (*beagle*), gatos, porcos, coelhos, macacos e ovelhas. Ratos, camundongos e cães são os animais mais comumente usados em modelos de hemorragia intracraniana ⁴.

O desenvolvimento do cérebro dos roedores recém-nascidos é comparável com 24-26 semanas do humano. Existe uma vasta literatura a respeito do desenvolvimento do cérebro dos roedores. Estes animais são adequados para estudos, pois são de fácil reprodução, e permitem fazer o seguimento comportamental rapidamente, em várias etapas da vida, em curto período de tempo, sendo menos dispendiosos que outras espécies ⁴.

Balasubramaniam e cols. desenvolveram um modelo de hemorragia subependimária injetando sangue autólogo dentro da região periventricular do cérebro de ratos no primeiro dia de vida. Após todos os ratos passaram por exames de ressonância magnética e histologia para verificar o sangramento. Observaram-se anormalidades no comportamento, sendo um modelo razoável de paralisia cerebral, decorrente da injeção de sangue autólogo dentro da matriz germinativa. Os autores demonstraram que, além do dano decorrente da extensão do hematoma, estava associada também a supressão da não proliferação celular na região da matriz germinativa. Este dano, provavelmente, depende em menor parte devido à ativação da trombina, e pode ser agravado pela pré-ativação do sistema imune ^{8, 88}.

Xue e col. apresentaram um modelo de hemorragia na região do estriado para camundongos RNs, com 10 dias de vida e adultos. Eles fizeram comparações injetando solução salina, sangue autólogo, trombina e plasminogênio e demonstraram que o dano cerebral no camundongo RN foi pior que com 10 dias de vida e no adulto. Em resumo: esses resultados demonstram que a injeção de sangue, trombina e plasminogênio, para dentro do

cérebro de ratos, está associada com a morte da célula e a inflamação, dependendo da idade. Postula-se que o cérebro neonatal é mais susceptível, devido à migração de células cerebrais imaturas e ao fato de o crescimento de vasos sanguíneos não estar pronto. Trombina e plasmina no sangue estão implicadas nesta lesão do cérebro ^{15, 59, 89}.

Plasmina também pode ativar a matriz de metaloproteinases, que podem causar dano aos vasos sanguíneos ⁹⁰. Dilatação ventricular pós-hemorragia intracraniana acarreta um alto índice de incapacidade, e não existe um método seguro e eficaz de tratamento. Cherian e cols. desenvolveram um modelo de hidrocefalia neonatal (com ratos com 7 dias de vida), induzindo a hemorragia com uma injeção de sangue citratado ou líquido cérebro-espinhal artificial, no ventrículo lateral, provocando diminuição no desempenho motor. Concluíram que este modelo é apropriado para o estudo da patogênese da dilatação ventricular ³⁰. Lodhia e cols. também utilizaram este modelo ⁹¹. Xue e Balasubramaniam também induziram hemorragia intraventricular em camundongos recém-nascidos de 1 dia de vida com sangue autólogo (15 microlitros; μ L) dentro do tecido periventricular pelo método de *freehand* e demonstraram que extravasamento do sangue tem um papel importante no dano cerebral e na supressão de proliferação celular ⁸.

Um método amplamente conhecido que produz hemorragia intracraniana dá-se através de injeção de colagenase (tipo IV, VII, IX) dentro do núcleo da base do cérebro, primeiramente introduzido por Rosenberg e cols., em ratos e, após, subsequentemente estudado em camundongos. Esta enzima digere o colágeno presente na lâmina basal dos vasos sanguíneos e causa sangramento no tecido cerebral produzindo extravasamento de eritrócitos e originando um sólido hematoma. Rosenberg e cols. utilizaram 0,5-1,0 Unidade (U) de colagenase diluída em 2 μ L de soro fisiológico. O tamanho final do hematoma foi diretamente proporcional à quantidade de colagenase administrada ⁹². Del Bigio e cols. também demonstraram que a colagenase causa significantes reações inflamatórias e outros prováveis mecanismos, que então produzem hemorragia intracraniana em humanos ^{14, 59}. No modelo com a colagenase o sangramento ocorre em 10-30 min após a injeção e desenvolve rapidamente um hematoma em 4-24 h. Observa-se edema até no máximo 24 h após indução, permanecendo por dias e causando deterioração da função neurológica ⁹². A reação inflamatória com a colagenase ocorre mais cedo, tornando-se mais prolongada do que com outros modelos de hemorragia ⁵⁹.

No modelo com injeção de sangue autólogo, o início da infiltração de neutrófilos começa com 24 h, com pico de 2-3 dias, desaparecendo entre o 3^o-7^o dia ⁹³. A infiltração dos neutrófilos foi semelhante, mas menos intensa que o modelo com colagenase. Dentro do

estudo com cães, com filhotes de beagles foram amplamente usados na década de 80 para o estudo da patogênese da hemorragia intraventricular e da matriz germinativa, devido ao fato de que com 1-2 dias de vida a matriz germinativa do beagle é muito semelhante à humana ⁴.

O grupo de Goddard's demonstrou que a indução rápida de hipertensão moderada com cloridrato de epinefrina = 0,1 miligramas/mililitro (mg/mL) sem hipercarbia tinha como consequência a hemorragia da matriz germinativa. A média de aumento da pressão foi de 53,68±1,10 milímetros de mercúrio (mmHg) para 81,92±5,14 mmHg observadas por volta de 1 h, através da artéria carótida. Logo, é difícil atribuir isto somente à hipertensão, pois não foram claramente estudados outros fatores, como hipoxia, acidose e isquemia ^{4, 94}. Leuschen e Nelson também demonstraram que beagles com seis dias de vida, expostos à asfixia, também desenvolvem hemorragia da matriz germinativa ⁴.

Em outro estudo Goddard's usou hipercarbia para causar hemorragia da matriz germinativa. A base do estudo foi aumentar a pressão de dióxido de carbono, hipercarbia por 1 h, produzindo significativa vasodilatação e aumento do fluxo cerebral e, com isto, hemorragia da matriz germinativa ⁹⁵.

Goddard-Finegold e cols. criaram um modelo de hipovolemia aguda com hipotensão, seguida de uma rápida autotransusão, sendo que correlacionaram a hemorragia da matriz germinativa com o aumento do fluxo sanguíneo cerebral. Johnson e cols. determinaram que a pressão parcial do dióxido de carbono, pressão sanguínea e a temperatura são as chaves para discriminar que animal poderia ter hemorragia ⁹⁶.

Os coelhos têm sido usados como modelos de hemorragia, pois alguns de seus aspectos são similares ao humano pré-termo. Com 28 dias de gestação o coelho é pré-termo, sendo prejudicial para o modelo, pois também apresenta hemorragia espontânea. Conner e cols., após terem feito cesariana em coelhas com 28 dias de gestação e injetando glicerol intraperitoneal (ip) nos recém-nascidos, provocaram HS-HIV. A grande falha neste modelo é que também pode-se produzir hemorragia em outros locais. Outros estudos sugerem o uso de furosemida e também o aumento da osmolaridade com bicarbonato de sódio, porém, estes não estão bem explicados, não tendo sido possível sua reprodução ^{4, 97}.

O cérebro dos porcos ao nascer é totalmente maduro, sem matriz germinativa e deposição extensa de mielina. Portanto, experimentos com porcos descrevem melhor a semelhança da injúria na patogênese cerebral na infância e em recém-nascidos à termo ⁴. Porcos recém-nascidos têm sido usados para se estudarem os efeitos dos hematomas na região subdural e subaracnóidea a partir de função e metabolismo do cérebro ^{98, 99}.

A hemorragia em gatos da matriz germinativa não está bem descrita; provavelmente o desenvolvimento do cérebro de gatos em tempo é semelhante ao dos cães. Turbeville e cols. encontraram associação ao injetar sobrecarga de sódio ip em gatinhos, provocando HIV¹⁰⁰. No entanto, este estudo, não demonstra claramente os sítios de hemorragia.

Em macacos a matriz germinativa com 100 dias de gestação é similar à com 24 semanas nos humanos. Esta involui por volta dos 162 dias de gestação. Em estudos anteriores, macacos desenvolveram hemorragia periventricular, secundária à isquemia da substância branca¹⁰¹.

O cérebro da ovelha com uma gestação de 147 dias ao nascimento é relativamente maduro, em comparação com o humano. A matriz germinativa na metade da gestação das ovelhas corresponde a 26-30 semanas no humano. O padrão vascular da matriz germinativa também é semelhante ao humano. Reynolds e cols. utilizaram fetos de ovelha com 58-85 dias de gestação, apresentando múltiplos focos de hemorragia na substância branca e córtex e induziram períodos de hipertensão arterial com asfixia¹⁰². Wheeler e cols. observaram que ovelhas submetidas à uma hora de hipotensão desenvolveram hemorragia subaracnóidea. O uso de ovelhas para o estudo não é adequado, pois a perfusão cerebral é menor do que em humanos, e o cérebro das ovelhas recém-nascidas também é praticamente maduro, sem matriz germinativa e com considerável mielina^{4, 102}.

1.4 DESENVOLVIMENTO DOS VASOS SANGUÍNEOS DO RATO

A estrutura e função dos capilares no SNC têm despertado um interesse especial desde que sua existência foi descrita por Ehrlich (1885). Através da injeção de contrastes e da observação da penetração destes no tecido cerebral, constatou-se que a barreira entre os vasos e o tecido cerebral ocorre em diferentes períodos nos diferentes animais estudados (ratos, coelhos). Nos ratos, já está presente desde o 10º dia de gestação e evolui conforme o crescimento destes animais¹⁰³.

Durante a formação intraútero, aproximadamente nos 12º-14º dias de gestação, a primeira manifestação da formação vascular tem características de um cordão sinusoidal, isto é, de espessura irregular e com a parede do endotélio perfurada por fenestrações, sendo este o início do material que vai compor a membrana basal (MB)¹⁰⁴. O desenvolvimento dos capilares, dos vasos preexistentes, inicia no 15º dia de gestação. A diferenciação futura e o estabelecimento definitivo da arquitetura são acompanhados pela maturação do tecido

cortical, ou seja, diminuição do espaço extracelular, diferenciação da parte perivascular, da astroglia e dos elementos neuronais concluindo o desenvolvimento das sinapses ¹⁰⁴.

No 20º dia de gestação dos ratos, as células endoteliais são abundantes no citoplasma. O retículo endoplasmático é expandido e consiste de canalículos dilatados e vesículas. Os grânulos de ribonucleoproteína estão normalmente independentes e aparecem como partículas no citoplasma. As células da membrana endotelial tornam-se espessas, formando tortuosidades bem definidas. As células endoteliais são separadas das outras células do sistema nervoso, por uma região com substância amorfa, com densidade variável, que vai formar a MB imatura. Esta região é delimitada pelas células da membrana, das células endoteliais, das células neurais e das células gliais. A distância das células se mantém praticamente igual nestes animais, seja no rato jovem ou rato adulto. Pericistos estão presentes, embora difíceis de serem vistos neste período ¹⁰⁵.

No rato recém-nascido e com 3 dias de vida, as mudanças nas estruturas são somente de grau. O citoplasma das células endoteliais é abundante e contém numerosas vesículas e muitos grânulos de ribonucleoproteínas. A MB normalmente é larga e mais densa do que no período fetal, entanto, não ocorre mudança na distância intercelular e nem há variação na densidade ¹⁰³.

No 8º dia de vida dos ratos, o citoplasma das células endoteliais é grosso, há microvilosidades, vesículas são numerosas, bem como as vesículas do complexo de Golgi podem ser distinguidas. Canalículos dilatados e vesículas não são tão numerosos como no período fetal. A MB fica ampla e densa, e, como consequência disto, os pericistos ficam mais proeminentes ¹⁰³.

No 12º dia de idade, o citoplasma das células endoteliais é grosso e contém poucos cistos dilatados. A MB é usualmente mais densa e grossa que em animais mais jovens. Os capilares estão envolvidos por tecido adjacente e estas células fazem contato com a MB ¹⁰³.

No rato de 14 dias a MB é usualmente bem definida e com densidade intermediária. A espessura e densidade das células endoteliais também são variáveis. Há locais, mesmo nesta idade, em que a MB é mais estreita do que entre as células neurais ¹⁰³.

Em resumo, o contínuo processo de formação da MB, desde o primeiro aparecimento até a espessura maior no período perinatal, é descrito por quatro sucessivos estágios ¹⁰⁶:

- Estágio 1: acúmulo local de finos filamentos de material entre o endotélio e a face oposta perivascular dos sinusoides;
 - Estágio 2: delicados filamentos são anexados ao endotélio e adjacentes à membrana plasmática (MP) glial de capilares imaturos;
-

-
- Estágio 3: uma fina e contínua lâmina densa se adapta à MP. Estes filamentos são ordenados paralelamente à superfície celular;
 - Estágio 4: aumento da lâmina densa, um padrão condensado dos filamentos, sendo o estágio dos capilares corticais maduros.

Logo então, coincidentemente, com o rápido espessamento da MB na 3^a-4^a semana pós-natal, as características do crescimento capilar mudam. Quimicamente a MB consiste de um tipo especial de colágeno e outras glicoproteínas ¹⁰⁷. Em trabalho onde se injetaram substâncias que antagonizaram a reformulação destas glicoproteínas (após indução de ruptura por collagenase), houve maior demora para a MB se reestruturar. Isto mostra a necessidade destas glicoproteínas e do colágeno para a devida estrutura e funcionamento da MB ¹⁰⁸. Esta formação de vasos de acordo com o descrito por Klorovskii: de um cordão de células desenvolve-se o tecido cerebral; os vasos moldam-se como “tentáculos” que, posteriormente, se unem. Existe um período com mais espaço extracelular nos primeiros 10 dias de vida (e menos vasos) e, após, aos 10 dias (10-20), há maior crescimento e diminuição posterior do espaço extracelular ¹⁰⁹.

Já no rato adulto, o citoplasma das células endoteliais é mais fino, e contém menos vesículas do que no animal imaturo. Os vasos terminais são menos proeminentes. A MB é muito mais grossa e densa que no animal jovem; também é relativamente uniforme, embora varie conforme os vasos que estejam em volta ¹⁰³.

1.5 COLAGENASE

Colagenases são enzimas muito específicas que clivam ligações peptídicas nas regiões de hélice tríplice do colágeno. Foi em 1953 pela primeira vez purificada e fermentada por MacLennan, Mandl e Howes. A collagenase é produzida por vários microorganismos e por diferentes células de animais. Dentre os vários organismos capazes de produzirem estas enzimas, estão as leveduras. Elas são encontradas também em bactérias, como o *Clostridium histolyticum* da gangrena gaseosa. As colagenases possuem as mais variadas aplicações. Destacam-se as aplicações na indústria de fármacos, onde são utilizadas no tratamento de cicatrizes hipertróficas, na indústria de cosméticos (dermocosméticos), usadas no tratamento de acne e rugas e nos laboratórios para separar células ¹¹⁰.

O colágeno em mamíferos chega a constituir a quarta parte do peso do animal, sendo abundante na pele, nos vasos, nos ossos, tendões, cartilagens e dentes. Há 19 tipos de

colágeno, que são assim classificados: (a) colágenos fibrilares (tipo I, II, III, V e XI), formando faixas em vários tecidos; (b) colágenos formadores de rede ou das membranas basais (IV); (c) filamentosas (VI); (d) com cadeia longa (VII); (e) com cadeia curta (VIII e IX); (f) associado com fibrila e tendo tríplice hélice interrompida; (g) multiplexinas (XV XVIII); (h) outros (XIII, XVII e XIX). Logo então existe uma colagenase específica para cada tipo de colágeno ^{110, 111}.

2 JUSTIFICATIVA

A hemorragia da matriz germinativa é a mais frequente entre recém-nascidos pré-termos abaixo de 34 semanas e com menos de 1500 g, ocasionando mortalidade elevada com sequelas graves e com qualidade de vida sombria. Desta forma, a proposta deste projeto é estabelecer um modelo animal (ratos recém-nascidos) de hemorragia da matriz germinativa que nos permita estudar melhor estas alterações para a busca de ações terapêuticas mais eficazes. Depois de estabelecido o modelo de hemorragia da matriz germinativa, analisar-se-á a avaliação morfofuncional (neuromotoras, cognitiva e histológica) dos animais submetidos à hemorragia da matriz germinativa.

2.1 HIPÓTESES ALTERNATIVAS

O paradigma de reconhecimento de objeto, o desempenho neuromotor e as alterações histopatológicas são piores em ratos submetidos à hemorragia com colagenase tipo VII, quando comparado ao grupo salina e controle.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é desenvolver um modelo experimental neonatal de hemorragia da matriz germinativa em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir hemorragia subependimária-intraventricular em ratos recém nascidos utilizando a injeção de colagenase tipo VII;
 - Avaliar a lesão produzida pela hemorragia através de testes cognitivos de reconhecimento de objetos e testes motores dos animais submetidos à hemorragia subependimária e dos controles;
 - Avaliar macro e microscopicamente o grau de lesão cerebral nos animais com hemorragia subependimária aos 7 e 30 dias de vida.
-

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berger R, Bender S, Sefkow S, Klingmuller V, Kunzel W, Jensen A. Peri/intraventricular haemorrhage: a cranial ultrasound study on 5286 neonates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*1997 Dec;75(2):191-203.
 2. Larroque B, Marret S, Ancel PY, Arnaud C, Marpeau L, Supernant K, et al. White matter damage and intraventricular hemorrhage in very preterm infants: the EPIPAGE study. *J Pediatr*2003 Oct;143(4):477-83.
 3. Kopelman B NdSA, Goulart A, et al. Diagnóstico e tratamento em neonatologia. Atheneu, editor. São Paulo. 2004.
 4. Balasubramaniam J, Del Bigio MR. Animal models of germinal matrix hemorrhage. *J Child Neurol*2006 May;21(5):365-71.
 5. Tapia JC, J. Very-low birth weight infant outcomes in 11 South American NICUs. *J Perinatol*2002;22:2.
 6. Baumert M, Brozek G, Paprotny M, Walencka Z, Sadowska H, Cnota W, et al. Epidemiology of peri/intraventricular haemorrhage in newborns at term. *J Physiol Pharmacol*2008 Sep;59 Suppl 4:67-75.
 7. Leone CS, LSR; Vaz, FC et al. Brazilian Neonatal Research Network very low birth weight infant morbidity and mortality. *Pediatr res*2001;49:405 A.
 8. Xue M, Balasubramaniam J, Buist RJ, Peeling J, Del Bigio MR. Periventricular/intraventricular hemorrhage in neonatal mouse cerebrum. *J Neuropathol Exp Neurol*2003 Nov;62(11):1154-65.
 9. Stathis SL, O'Callaghan M, Harvey J, Rogers Y. Head circumference in ELBW babies is associated with learning difficulties and cognition but not ADHD in the school-aged child. *Dev Med Child Neurol*1999 Jun;41(6):375-80.
 10. Hack M, Taylor HG. Perinatal brain injury in preterm infants and later neurobehavioral function. *Jama*2000 Oct 18;284(15):1973-4.
 11. Saigal S, Hoult LA, Streiner DL, Stoskopf BL, Rosenbaum PL. School difficulties at adolescence in a regional cohort of children who were extremely low birth weight. *Pediatrics*2000 Feb;105(2):325-31.
-

-
12. Schendel DE, Stockbauer JW, Hoffman HJ, Herman AA, Berg CJ, Schramm WF. Relation between very low birth weight and developmental delay among preschool children without disabilities. *Am J Epidemiol*1997 Nov 1;146(9):740-9.
 13. Ohlweiler L, da Silva AR, Barros SV, Riesgo R, Rotta NT. Influence of intracranial hemorrhage and neonatal seizures on the neurological and psychomotor development of premature infants at Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*2003 Dec;61(4):902-5.
 14. Belayev L, Saul I, Curbelo K, Busto R, Belayev A, Zhang Y, et al. Experimental intracerebral hemorrhage in the mouse: histological, behavioral, and hemodynamic characterization of a double-injection model. *Stroke*2003 Sep;34(9):2221-7.
 15. Xue M, Balasubramaniam J, Parsons KA, McIntyre IW, Peeling J, Del Bigio MR. Does thrombin play a role in the pathogenesis of brain damage after periventricular hemorrhage? *Brain Pathol*2005 Jul;15(3):241-9.
 16. Szymonowicz W, Schafler K, Cussen LJ, Yu VY. Ultrasound and necropsy study of periventricular haemorrhage in preterm infants. *Arch Dis Child*1984 Jul;59(7):637-42.
 17. Volpe JJ. Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*2001;7(1):56-64.
 18. Hambleton G, Wigglesworth JS. Pathogenesis of intraventricular hemorrhage. *J Pediatr*1979 Jan;94(1):159-61.
 19. Hambleton G, Wigglesworth JS. Origin of intraventricular haemorrhage in the preterm infant. *Arch Dis Child*1976 Sep;51(9):651-9.
 20. Carvalho MF SV. *Cuidados Intensivos no Período Neonatal*. ed. Savier ed. São Paulo1999.
 21. Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. 4ª edição ed. Saunders. W, editor. Philadelphia2000.
 22. Volpe JJ. Brain injury in the premature infant. Neuropathology, clinical aspects, pathogenesis, and prevention. *Clin Perinatol*1997 Sep;24(3):567-87.
 23. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr*1978 Apr;92(4):529-34.
-

-
24. Volpe JJ. Intraventricular hemorrhage and brain injury in the premature infant. Diagnosis, prognosis, and prevention. *Clin Perinatol*1989 Jun;16(2):387-411.
 25. Silveira RC, Procianoy RS. [Ischemic brain damage in very low birth weight preterm newborn infants]. *J Pediatr (Rio J)*2005 Mar;81(1 Suppl):S23-32.
 26. Whitelaw A, Cherian S, Thoresen M, Pople I. Posthaemorrhagic ventricular dilatation: new mechanisms and new treatment. *Acta Paediatr Suppl*2004 Feb;93(444):11-4.
 27. Wells JT, Ment LR. Prevention of intraventricular hemorrhage in preterm infants. *Early Hum Dev*1995 Aug 18;42(3):209-33.
 28. Burstein J, Papile LA, Burstein R. Intraventricular hemorrhage and hydrocephalus in premature newborns: a prospective study with CT. *AJR Am J Roentgenol*1979 Apr;132(4):631-5.
 29. Burstein J, Papile L, Burstein R. Subependymal germinal matrix and intraventricular hemorrhage in premature infants: diagnosis by CT. *AJR Am J Roentgenol*1977 Jun;128(6):971-6.
 30. Cherian SS, Love S, Silver IA, Porter HJ, Whitelaw AG, Thoresen M. Posthemorrhagic ventricular dilation in the neonate: development and characterization of a rat model. *J Neuropathol Exp Neurol*2003 Mar;62(3):292-303.
 31. Dammann O, Leviton A. Inflammation, brain damage and visual dysfunction in preterm infants. *Semin Fetal Neonatal Med*2006 Oct;11(5):363-8.
 32. Leviton A, Paneth N. White matter damage in preterm newborns--an epidemiologic perspective. *Early Hum Dev*1990 Oct;24(1):1-22.
 33. Margotto P. *Assistência ao Recém-nascido de Risco*. ed. Pórfiro ed. Brasília2004.
 34. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*2008 Mar;93(2):F153-61.
 35. Ghazi-Birry M. Human germinal matrix: venous origin of hemorrhage and vascular characteristics. *Am J Neuroradiol*1997;18:219-24.
 36. Volpe JJ. Cerebral white matter injury of the premature infant-more common than you think. *Pediatrics*2003 Jul;112(1 Pt 1):176-80.
-

-
37. Andrews T, Zhang P, Bhat NR. TNFalpha potentiates IFNgamma-induced cell death in oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci Res*1998 Dec 1;54(5):574-83.
 38. Dammann O, Leviton A. Placental cytokine expression in preterm labour and the fetal inflammatory response. *Cytokine*2000 Feb;12(2):176-7.
 39. Dammann O, O'Shea TM. Cytokines and perinatal brain damage. *Clin Perinatol*2008 Dec;35(4):643-63, v.
 40. Stroemer P RN. Exacerbation of the ischaemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-18 in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*1998;18:833-9.
 41. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sebire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology*2001 May 22;56(10):1278-84.
 42. Yoon BH, Romero R, Jun JK, Park KH, Park JD, Ghezzi F, et al. Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Obstet Gynecol*1997 Oct;177(4):825-30.
 43. Yoon BH, Jun JK, Romero R, Park KH, Gomez R, Choi JH, et al. Amniotic fluid inflammatory cytokines (interleukin-6, interleukin-1beta, and tumor necrosis factor-alpha), neonatal brain white matter lesions, and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol*1997 Jul;177(1):19-26.
 44. Jun JK, Yoon BH, Romero R, Kim M, Moon JB, Ki SH, et al. Interleukin 6 determinations in cervical fluid have diagnostic and prognostic value in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*2000 Oct;183(4):868-73.
 45. Perlman JM, Risser R, Broyles RS. Bilateral cystic periventricular leukomalacia in the premature infant: associated risk factors. *Pediatrics*1996 Jun;97(6 Pt 1):822-7.
 46. Kumazaki K, Nakayama M, Sumida Y, Ozono K, Mushiake S, Suehara N, et al. Placental features in preterm infants with periventricular leukomalacia. *Pediatrics*2002 Apr;109(4):650-5.
 47. Nakamura T, Keep RF, Hua Y, Park JW, Itano T, Nagao S, et al. Intracerebral hemorrhage induces edema and oxidative stress and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunits expression. *Acta Neurochir Suppl*2005;95:421-4.
-

-
48. Spinillo A, Capuzzo E, Stronati M, Ometto A, Orcesi S, Fazzi E. Effect of preterm premature rupture of membranes on neurodevelopmental outcome: follow up at two years of age. *Br J Obstet Gynaecol*1995 Nov;102(11):882-7.
 49. Spinillo A, Chiara A, Bergante C, Biancheri D, Fabiana D, Fazzi E. Obstetric risk factors and persistent increases in brain parenchymal echogenicity in preterm infants. *Bjog*2004 Sep;111(9):913-8.
 50. Spinillo A, Capuzzo E, Stronati M, Ometto A, De Santolo A, Acciano S. Obstetric risk factors for periventricular leukomalacia among preterm infants. *Br J Obstet Gynaecol*1998 Aug;105(8):865-71.
 51. Shalak L PJ. Hemorrhagic-ischemic cerebral injury in the preterm infant: current concepts. *Clin Perinatol*2002;29:745-63.
 52. Baud O. Antenatal corticosteroid therapy: benefits and risks. *Acta Paediatr Suppl*2004 Feb;93(444):6-10.
 53. Baud O. Postnatal steroid treatment and brain development. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*2004 Mar;89(2):F96-100.
 54. Baud O, Sola A. Corticosteroids in perinatal medicine: how to improve outcomes without affecting the developing brain? *Semin Fetal Neonatal Med*2007 Aug;12(4):273-9.
 55. Baud O, Foix-L'Helias L, Kaminski M, Audibert F, Jarreau PH, Papiernik E, et al. Antenatal glucocorticoid treatment and cystic periventricular leukomalacia in very premature infants. *N Engl J Med*1999 Oct 14;341(16):1190-6.
 56. Takashima S, Koga M, Tanaka K. Fibrinolytic activity of human brain and cerebrospinal fluid. *Br J Exp Pathol*1969 Dec;50(6):533-9.
 57. Takashima S, Tanaka, K. *Microangiography and fibrinolytic activity in subependymal matrix of the premature brain*. *Brain Dev*1972; 4: p. 222.
 58. Xi G, Hua Y, Keep RF, Younger JG, Hoff JT. Brain edema after intracerebral hemorrhage: the effects of systemic complement depletion. *Acta Neurochir Suppl*2002;81:253-6.
 59. Xue M, Del Bigio MR. Comparison of brain cell death and inflammatory reaction in three models of intracerebral hemorrhage in adult rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis*2003 May-Jun;12(3):152-9.
-

-
60. Fujimoto S, Katsuki H, Ohnishi M, Takagi M, Kume T, Akaike A. Plasminogen potentiates thrombin cytotoxicity and contributes to pathology of intracerebral hemorrhage in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*2008 Mar;28(3):506-15.
 61. Xue M, Del Bigio MR. Injections of blood, thrombin, and plasminogen more severely damage neonatal mouse brain than mature mouse brain. *Brain Pathol*2005 Oct;15(4):273-80.
 62. Ment LR, Ehrenkranz RA, Duncan CC. Intraventricular hemorrhage of the preterm neonate: prevention studies. *Semin Perinatol*1988 Oct;12(4):359-72.
 63. Ment LR, Duncan CC, Stewart WB. Perinatal cerebral insults: hemorrhage and ischemia. *Pediatr Neurosci*1985;12(3):168-74.
 64. Ramsey PS, Rouse DJ. Therapies administered to mothers at risk for preterm birth and neurodevelopmental outcome in their infants. *Clin Perinatol*2002 Dec;29(4):725-43.
 65. HeatherJ.McCrea P, b, Laura R.Ment, MDc,d. The diagnosis, management, and postnatal prevention of intraventricular hemorrhage in the preterm neonate. *Clin Perinatol*2008;35:777-92.
 66. Bada H. Prevention of intracranial hemorrhage. *Neoreviews*2000;I:e:48-58.
 67. Carteaux P, Cohen H, Check J, George J, McKinley P, Lewis W, et al. Evaluation and development of potentially better practices for the prevention of brain hemorrhage and ischemic brain injury in very low birth weight infants. *Pediatrics*2003 Apr;111(4 Pt 2):e489-96.
 68. Atwater A, Hartmann E, Brown BB, Carteaux P, Freeman M, Hegwood P, et al. Evaluation and development of potentially better practices for staffing in neonatal intensive care units. *Pediatrics*2006 Nov;118 Suppl 2:S134-40.
 69. Shankaran S, Papile LA, Wright LL, Ehrenkranz RA, Mele L, Lemons JA, et al. The effect of antenatal phenobarbital therapy on neonatal intracranial hemorrhage in preterm infants. *N Engl J Med*1997 Aug 14;337(7):466-71.
 70. Ment LR, Vohr B, Allan W, Westerveld M, Sparrow SS, Schneider KC, et al. Outcome of children in the indomethacin intraventricular hemorrhage prevention trial. *Pediatrics*2000 Mar;105(3 Pt 1):485-91.
-

-
71. Ment LR, Oh W, Ehrenkranz RA, Philip AG, Vohr B, Allan W, et al. Low-dose indomethacin and prevention of intraventricular hemorrhage: a multicenter randomized trial. *Pediatrics*1994 Apr;93(4):543-50.
 72. Schmidt B, Davis P, Moddemann D, Ohlsson A, Roberts RS, Saigal S, et al. Long-term effects of indomethacin prophylaxis in extremely-low-birth-weight infants. *N Engl J Med*2001 Jun 28;344(26):1966-72.
 73. Fowlie PW, Davis PG. Prophylactic indomethacin for preterm infants: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*2003 Nov;88(6):F464-6.
 74. Fowlie PW, Davis PG. Prophylactic intravenous indomethacin for preventing mortality and morbidity in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*2002(3):CD000174.
 75. Fowlie PW. Prophylactic indomethacin: systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*1996 Mar;74(2):F81-7.
 76. McLendon D, Check J, Carteaux P, Michael L, Moehring J, Secrest JW, et al. Implementation of potentially better practices for the prevention of brain hemorrhage and ischemic brain injury in very low birth weight infants. *Pediatrics*2003 Apr;111(4 Pt 2):e497-503.
 77. Cooke RW. Trends in incidence of cranial ultrasound lesions and cerebral palsy in very low birthweight infants 1982-93. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*1999 Mar;80(2):F115-7.
 78. Canterino JC, Verma U, Visintainer PF, Elimian A, Klein SA, Tejani N. Antenatal steroids and neonatal periventricular leukomalacia. *Obstet Gynecol*2001 Jan;97(1):135-9.
 79. Leviton A, Dammann O, Allred EN, Kuban K, Pagano M, Van Marter L, et al. Antenatal corticosteroids and cranial ultrasonographic abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*1999 Oct;181(4):1007-17.
 80. Van Marter LJ, Allred EN, Leviton A, Pagano M, Parad R, Moore M. Antenatal glucocorticoid treatment does not reduce chronic lung disease among surviving preterm infants. *J Pediatr*2001 Feb;138(2):198-204.
 81. Hoff JT, Xi G. Brain edema from intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*2003;86:11-5.
-

-
82. Gong Y, Hua Y, Keep RF, Hoff JT, Xi G. Intracerebral hemorrhage: effects of aging on brain edema and neurological deficits. *Stroke*2004 Nov;35(11):2571-5.
 83. Paneth N. Classifying brain damage in preterm infants. *J Pediatr*1999 May;134(5):527-9.
 84. Perlman JM. Neurobehavioral deficits in premature graduates of intensive care--potential medical and neonatal environmental risk factors. *Pediatrics*2001 Dec;108(6):1339-48.
 85. Botting N, Powls A, Cooke RW, Marlow N. Attention deficit hyperactivity disorders and other psychiatric outcomes in very low birthweight children at 12 years. *J Child Psychol Psychiatry*1997 Nov;38(8):931-41.
 86. Peterson BS, Anderson AW, Ehrenkranz R, Staib LH, Tageldin M, Colson E, et al. Regional brain volumes and their later neurodevelopmental correlates in term and preterm infants. *Pediatrics*2003 May;111(5 Pt 1):939-48.
 87. Yager JY. Animal models of hypoxic-ischemic brain damage in the newborn. *Semin Pediatr Neurol*2004 Mar;11(1):31-46.
 88. Balasubramaniam J, Xue M, Buist RJ, Ivanco TL, Natuik S, Del Bigio MR. Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. *Exp Neurol*2006 Jan;197(1):122-32.
 89. Wang H RG. Thrombin signaling in the brain; the role of protease-activated receptors. *Biol Chem*2003;384:193-202.
 90. Indyk JA CZ, Strickland S. . Proteases and degradation of extracellular matrix in neurodegeneration. *Fibrinol Proteol*1999;13:64-71.
 91. Lodhia KR, Shakui P, Keep RF. Hydrocephalus in a rat model of intraventricular hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*2006;96:207-11.
 92. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*1990 May;21(5):801-7.
 93. Xue M, Del Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death. *Neurosci Lett*2000 Apr 14; 283(3):230-2.
-

-
94. Goddard J, Lewis RM, Armstrong DL, Zeller RS. Moderate, rapidly induced hypertension as a cause of intraventricular hemorrhage in the newborn beagle model. *J Pediatr*1980 Jun;96(6):1057-60.
 95. Goddard J, Lewis RM, Alcalá H, Zeller RS. Intraventricular hemorrhage--an animal model. *Biol Neonate*1980;37(1-2):39-52.
 96. Goddard-Finegold J, Armstrong D, Zeller RS. Intraventricular hemorrhage, following volume expansion after hypovolemic hypotension in the newborn beagle. *J Pediatr*1982 May;100(5):796-9.
 97. Conner ES, Lorenzo AV, Welch K, Dorval B. The role of intracranial hypotension in neonatal intraventricular hemorrhage. *J Neurosurg*1983 Feb;58(2):204-9.
 98. Yakubu MA, Shibata M, Leffler CW. Hematoma-induced enhanced cerebral vasoconstrictions to leukotriene C4 and endothelin-1 in piglets: role of prostanoids. *Pediatr Res*1995 Jul;38(1):119-23.
 99. Yakubu MA, Leffler CW. Role of endothelin-1 in cerebral hematoma-induced modification of cerebral vascular reactivity in piglets. *Brain Res*1996 Sep 23;734(1-2):149-56.
 100. Turbeville DF, Bowen FW, Jr., Killam AP. Intracranial hemorrhages in kittens: hypernatremia versus hypoxia. *J Pediatr*1976 Aug;89(2):294-7.
 101. Myers RE. Four patterns of perinatal brain damage and their conditions of occurrence in primates. *Adv Neurol*1975;10:223-34.
 102. Reynolds ML, Evans CA, Reynolds EO, Saunders NR, Durbin GM, Wigglesworth JS. Intracranial haemorrhage in the preterm sheep fetus. *Early Hum Dev*1979 Jul;3(2):163-86.
 103. Donahue S, Pappas GD. The fine structure of capillaries in the cerebral cortex of the rat at various stages of development. *Am J Anat*1961 May;108:331-47.
 104. Caley DW, Maxwell DS. Development of the blood vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*1970 Jan;138(1):31-47.
 105. Palade GE. A study of fixation for electron microscopy. *J Exp Med*1952 Mar;95(3):285-98.
-

106. Bar T, Wolff JR. The formation of capillary basement membranes during internal vascularization of the rat's cerebral cortex. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*1972;133(2):231-48.
 107. Lee PA, Blasey K, Goldstein IJ, Pierce GB. Basement membrane: carbohydrates and x-ray diffraction. *Exp Mol Pathol*1969 Jun;10(3):323-30.
 108. Roberts AMG, G; Miskulin, M; Moati, F. . Mechanism of action of collagenase on the permeability of the blood-brain barrier. *Neurochemical Research*1977;2:449-55.
 109. Klovskii B. *The Development of the Brain*. New York1963:275.
 110. Bond MD, Van Wart HE. Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochemistry*1984 Jun 19;23(13):3085-91.
 111. Harper E. Collagenases. *Annu Rev Biochem*1980; 49:1063-78.
-

CAPÍTULO II

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ETAPAS E ESTRATÉGIAS EXPERIMENTAIS

Realizou-se um estudo para o desenvolvimento de um modelo experimental de HS-HIV em ratos recém-nascidos, no período de março de 2007 a dezembro de 2008. O estudo foi controlado, cego para o procedimento realizado durante as análises e acompanhado por 30 dias. A pesquisa foi dividida em três fases experimentais: fase I, para o estabelecimento do modelo de HS-HIV (ou da matriz germinativa); fase II, para avaliação da repercussão neuromotora e cognitiva; fase III, para avaliação histológica do encéfalo.

A pesquisa foi realizada no Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), que apresenta uma estrutura tecnológica básica onde foi desenvolvido este projeto, realizado em 3 centros: o Centro de Memória, o Centro de Gerontologia Molecular e Funcional e o Laboratório de Neurociências.

5.2 DELINEAMENTO

O presente trabalho apresenta características de um estudo controlado, experimental e cego.

5.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo seguiu os protocolos experimentais conforme normas internacionais e nacionais de experimentação com animais de laboratório. Estes receberam cuidados adequados, tendo sido submetidos ao mínimo de desconforto possível e de “*stress*”. Foi tomado o cuidado para reduzir ao mínimo o número de animais utilizados neste estudo. Em todos os procedimentos a que os animais foram submetidos foi empregada sedação e analgesia de acordo com a necessidade, para evitar o seu sofrimento. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, registro CEP 07/03955.

5.4 ANIMAIS

O modelo experimental de hemorragia subependimária foi realizado com ninhadas de ratos *Wistar*. Ratas *Wistar* prenhas provenientes do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) foram mantidas no alojamento para animais do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, onde permaneceram em ambiente climatizado ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 em 12 h, com água e ração *ad libitum*. O dia do nascimento dos animais foi registrado pela pesquisadora e foi dado como o dia pós-natal 1 (P1). Aos 21 dias de vida, foi realizado o desmame dos animais. As ninhadas utilizadas no estudo foram padronizadas de 8 a 10 animais.

Os protocolos utilizados seguiram as normas internacionais de experimentação com animais de laboratório, e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da PUCRS. Todos os procedimentos foram realizados tomando-se os cuidados necessários para reduzir o número de animais empregados e o seu sofrimento.

5.5 FASE I – ESTABELECIMENTO DO MODELO DE HEMORRAGIA SUBEPENDIMÁRIA-INTRAVENTRICULAR

5.5.1 Estudo piloto

Conforme estudos já realizados previamente sabe-se que ratos recém-nascidos (P1) correspondem a 24-26 semanas de IG em humanos e que 1 dia equivale a 1 semana de IG no humano^{4, 112}. O cérebro de ratos no P7 tem sido histologicamente comparado ao desenvolvimento cerebral de fetos com 32-34 semanas de IG, ou seja, a camada cortical está completa e há pouca mielinização na substância branca^{113, 114}.

Para o desenvolvimento do modelo de hemorragia a partir da matriz germinativa, foi organizado um grupo piloto a fim de se determinarem o local exato e a quantidade de colagenase que poderiam provocar HS-HIV, através de *freehand* injetando azul de metileno. Para isto foi utilizada a distância orelha-olho para determinar a coordenada da região subependimária, dividida em três subgrupos: 1 mm (n=3), 2 mm (n=3), 3 mm (n=3) e com profundidade de 1 mm, 2 mm e 3 mm (Figura 1). E para determinar a quantidade de colagenase foram testadas dosagens de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 Unidades (U) de colagenase com n=3,0 para cada concentração (Figura 2). E chegou-se à conclusão de que 2 U de colagenase

tipo VII provocariam hemorragia da matriz germinativa, sendo esta determinada pela macroscopia e histologia ¹¹⁵.

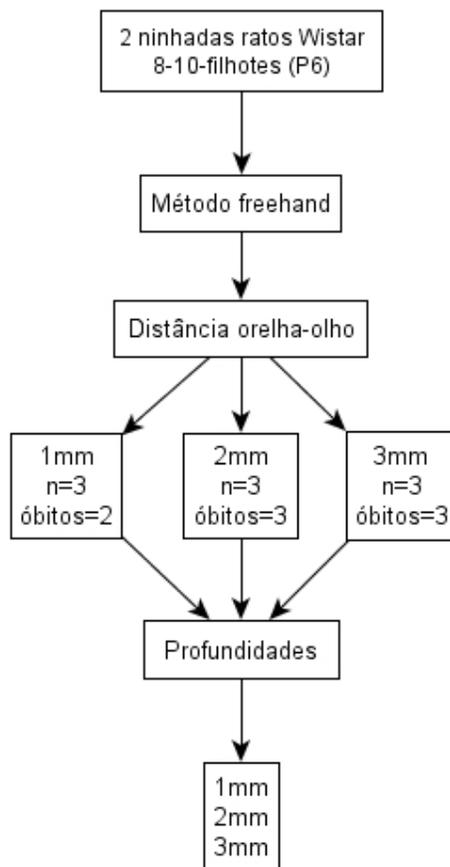


Figura 1 – Diagrama de execução do teste piloto para determinar coordenadas no método de *freehand*.

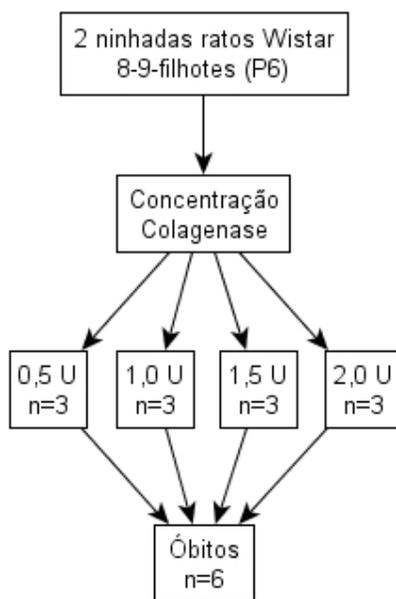


Figura 2 – Diagrama de teste piloto para determinar a concentração ideal para provocar hemorragia subependimária-intraventricular.

5.5.2 Estudo experimental

O estudo experimental constou de 2 grupos: (1) Hemorragia unilateral; (2) Hemorragia bilateral. Dentro destes grupos existiram mais 3 subgrupos, a saber, controle negativo, grupo salina (Soro Fisiológico) e colagenase. Na hemorragia unilateral o subgrupo constava de controle negativo n=12, salina n=12, colagenase n=12. Na hemorragia bilateral o subgrupo era salina n=10 e colagenase n=9. Estes grupos realizaram os testes neuromotores e cognitivos (Figura 4). Foram também utilizadas mais 2 ninhadas para provocar hemorragia unilateral e bilateral e observar macroscópica e histologicamente as alterações provocadas no P7 (24 h após o procedimento). Os subgrupos foram controle (n=4), grupo salina (n=4) e o colagenase (n=4), para hemorragia unilateral e bilateral.

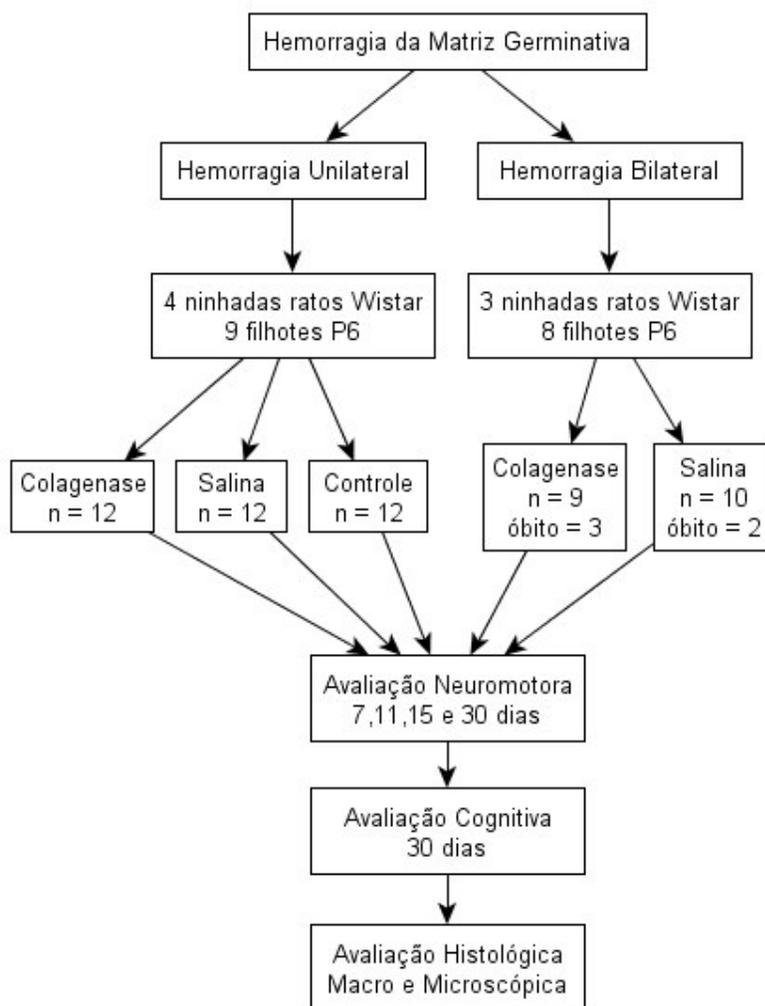


Figura 3 - Diagrama do protocolo experimental.

Os filhotes eram pesados e após colocados sobre um lençol térmico para manter a temperatura, pois há estudos comprovando que a hipotermia protegeria contra a hemorragia ¹¹⁶. Logo após, foram anestesiados com halotano através de uma máscara anestésica ¹¹⁷. Colocados na posição ventral com as patas posteriores e anteriores em extensão, a cabeça era fixada com a mão esquerda do pesquisador e puncionada com a mão direita na região lateral a 2 mm para frente da orelha direita, numa linha imaginária horizontal da orelha ao olho e introduziu-se uma agulha número 27 G com 3 mm de profundidade, previamente já marcada (Figura 4). O conteúdo da agulha era de 2 Unidades (U) de colagenase tipo VII (*Sigma Chemical Co.*) injetado através de uma seringa Hamilton (de 5 μ L) em 2 μ L de solução salina na região subependimária-intraventricular. E para o grupo salina eram injetados 2 μ L de soro fisiológico. Para o grupo controle negativo não era feita nada a não ser pesagem. Após a

introdução da agulha, esperava-se 2 min para a retirada cuidadosa, para evitar sangramento extra, pela retirada abrupta da mesma, conforme estudos anteriores com estereotaxia^{30, 92, 115, 118}. Os animais ficaram em observação sob luz aquecida por 10-15 min após o procedimento, quando então foram devolvidos às suas caixas com suas respectivas mães.

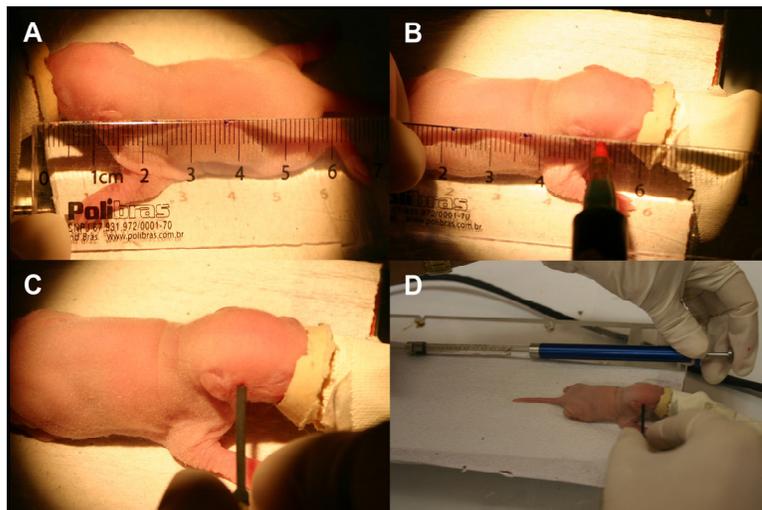


Figura 4 – Técnica de *freehand* para indução de hemorragia subependimária-intraventricular. (A) Determinação da distância orelha-olho medindo através de uma regra; (B) Marcação do local de introdução da agulha; (C) Introdução da agulha; (D) Injeção de collagenase.

Os animais foram desmamados no P21, quando então eram separados da mãe e colocados em caixas separadas. No grupo 2, para produzir a hemorragia bilateral foram seguidos os mesmos procedimentos da hemorragia unilateral, entretanto, também era feito o procedimento no lado esquerdo, empregando-se a mesma técnica. Os testes neuromotores, cognitivos e histológicos foram cegados para o investigador.

5.6 FASE II – AVALIAÇÃO DA REPERCUSSÃO NEUROMOTORA

5.6.1 Avaliação comportamental e neuromotora

Os animais foram avaliados após 24 h do procedimento, no P7, P11, P15 e P30. Estes testes incluíam avaliação de reflexos neonatais: reflexo de endireitamento (*surface rigthing*), geotaxia negativa (*negative geotaxis*) e preensão das patas anteriores (*forelimb grip*); testes de atividades neuromotoras e exploratórias: ambulação (*ambulation*), teste do cilindro, teste do campo aberto (*open field*) e avaliação de reconhecimento de objetos^{113, 117, 119}.

Aproximadamente 5 min antes de realizarem os testes, a mãe foi separada dos filhotes. Estes foram retirados das caixas e pesados. Os reflexos neonatais foram realizados entre o P7 e P15¹²⁰.

5.6.1.1 Reflexo de endireitamento

O reflexo de endireitamento consiste no posicionamento do filhote sobre uma superfície. Foi colocado delicadamente virado de costas sobre uma superfície plana. O tempo para retornar à posição de pé era registrado. A duração do tempo era limitada a 2 min. Esse teste foi realizado três vezes para cada animal e após calculada a média no P7, P11, P15^{88, 119} (Figura 5).

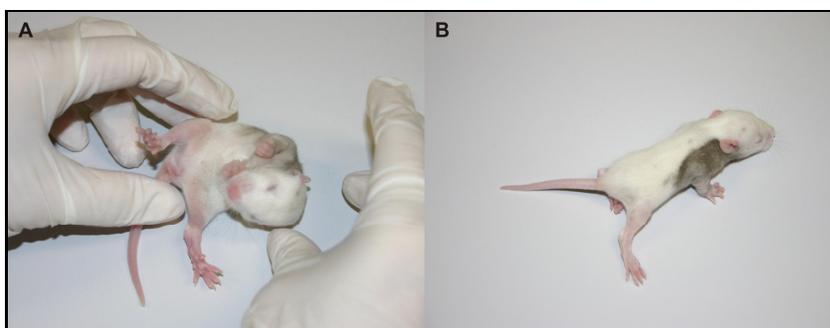


Figura 5 - O reflexo de endireitamento. (A) posicionamento dorsal; (B) posicionamento de virada.

5.6.1.2 Geotaxia negativa

A geotaxia negativa reflete a preferência dos filhotes de ficar olhando para cima numa superfície inclinada. Os filhotes foram colocados com a cabeça para baixo numa superfície inclinada a 25°. Foram mantidos nessa posição com cuidado por aproximadamente 5 segundos antes de serem soltos. O tempo para a posição de face foi registrado. O tempo máximo foi de 2 min. Repetiu-se o teste 3 vezes e após foi calculada uma média. Foi realizado no P7, P11 e P15⁸⁸ (Figura 6).

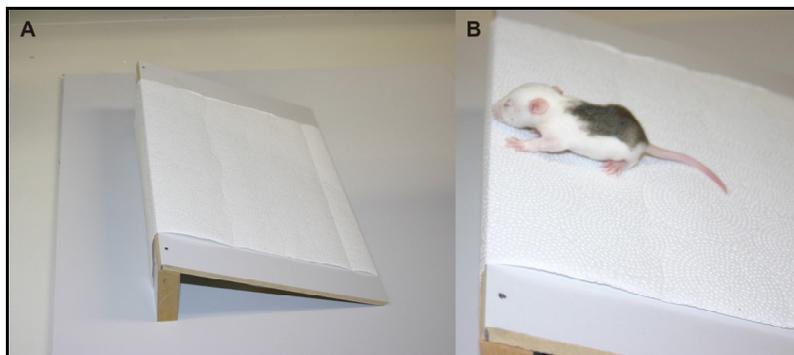


Figura 6 - Geotaxia negativa. (A) Plataforma com ângulo de 25° para realizar o teste. (B) Filhote realizando o teste na posição de olhar para cima numa superfície inclinada.

5.6.1.3 Teste de ambulação

O teste de ambulação foi realizado no P7, P11 e P15 e consistiu em observar por 5 min, sobre uma superfície plana de madeira de 50X50 cm, os movimentos dos filhotes. Os movimentos foram qualificados com a seguinte pontuação: sem movimento=0; movimentos assimétricos das patas=1; arrastando lentamente as patas =2; e caminhada rápida=3⁸⁸. (Figura 7).

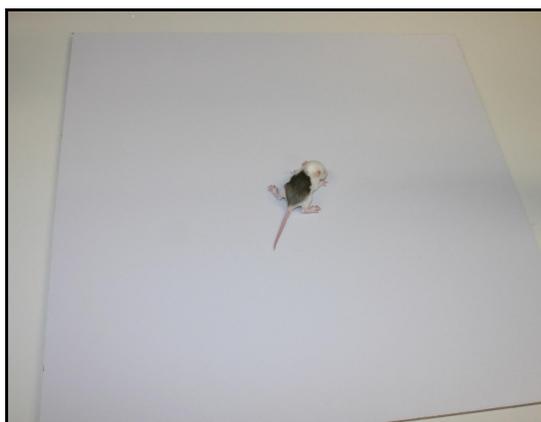


Figura 7 – Teste de ambulação.

5.6.1.4 Preensão das patas anteriores

O teste que avaliou a preensão das patas anteriores foi realizado no P11 e P15, com um pedaço de arame com diâmetro de 1,5 mm, com 70 cm de comprimento entre dois postes

de madeira e a uma altura de 40 cm com uma esponja macia entre os dois postes, para o filhote não se machucar. Foi medido o tempo de queda, estipulando como tempo máximo de 2 min. Ou seja, quanto mais rápida a queda, mais lesado estava o animal ⁸⁸. (Figura 8).

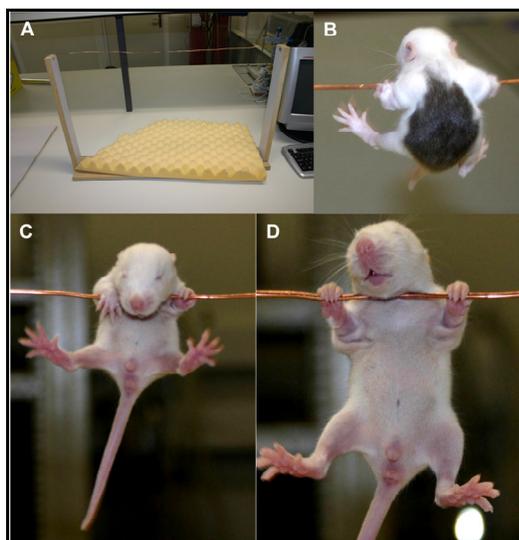


Figura 8 - Preensão das patas anteriores. (A) Aparelho para fazer o teste; (B-C-D) Filhote realizando o teste, segurando com as patas anteriores.

5.6.2 Avaliações das funções exploratória e cognitivas

Os filhotes permaneceram com a mãe até os 21 dias, após ocorreu o desmame, sendo avaliados no P30 por três testes: teste do reconhecimento de objetos; exploração do campo aberto, teste do cilindro, baseados em estudos prévios com ratos adultos. Todos os testes necessários para reavaliação foram gravados e após eram vistos por 2 avaliadores cegos.

5.6.2.1 Paradigma de reconhecimento de objetos

Para realização do paradigma de reconhecimento de objetos foi iniciado a habituação dos animais, com mais ou menos 26 dias de vida. O paradigma de reconhecimento de objetos utiliza a tendência natural que os roedores têm de explorar objetos novos para medir sua memória ¹²¹. A tarefa consiste em um treino no qual são apresentados dois objetos, seguido de um teste em que um dos objetos introduzidos durante o treino é substituído por um objeto

novo. Roedores sem lesão tendem a explorar o objeto novo por mais tempo, demonstrando assim memória do objeto familiar.

Para estes experimentos, os animais foram expostos a um campo aberto 60x40x50 centímetros (cm) comprimento x profundidade x altura, feito de madeira, com frente de vidro durante, 20 min, por 4 dias consecutivos para habituação, na ausência de objetos. O experimento foi realizado em uma sala silenciosa e com pouca iluminação. No quinto dia, foram dispostos no campo aberto, de maneira equidistante, dois objetos que diferiam entre si quanto à sua cor, altura, formato e textura, presos ao campo aberto pela base. Os objetos e o campo aberto foram limpos com etanol 70% após cada treino para remover dicas olfativas. Foram consideradas atividades exploratórias do animal: farejar o objeto ou tocá-lo com as patas anteriores ou focinho, mas não virar o objeto ou sentar-se nele, nem ficar com as quatro patas sobre o objeto. Durante o treino, os animais foram colocados no campo aberto durante 5 min. O tempo percentual gasto explorando cada objeto foi calculado e expresso como percentual do tempo total de exploração em segundos. (Figura 9). Os observadores eram cegos quanto aos grupos.

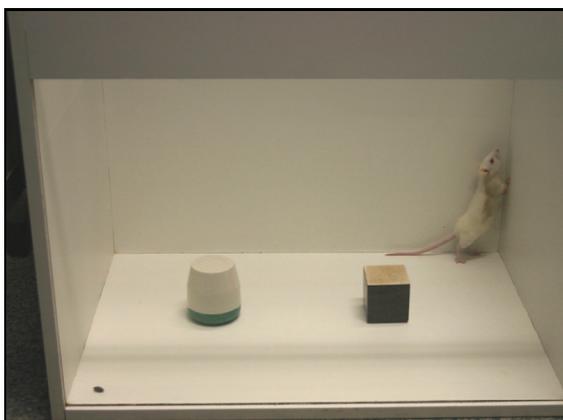


Figura 9 – Teste de reconhecimento de objetos.

O teste de retenção foi feito 24 h após a sessão de treino. Durante este teste, os animais foram novamente colocados no campo aberto, onde um dos objetos foi previamente trocado por outro com características de cor, formato, textura e alturas diferentes, e o tempo percentual gasto explorando cada objeto foi novamente calculado com intuito de avaliar a memória de longa duração. Durante o teste os animais permaneceram no campo aberto durante o mesmo tempo (5 min) do treino.

5.6.2.2 Teste do campo aberto

A atividade locomotora e o comportamento exploratório foram avaliados através da tarefa comportamental campo aberto. O aparato dessa avaliação constituiu-se de uma caixa de madeira compensada com dimensões de 60 x 40 cm, circundada por paredes altas de 50 cm e uma parede frontal de vidro transparente, possibilitando a observação do avaliador (Figura 10). O assoalho do campo aberto foi dividido em 12 áreas iguais por linhas pretas. Os animais foram colocados na sala de experimentação após 24 h do teste do reconhecimento de objeto, previamente já aclimatizados antes da realização do teste. O experimento foi realizado em uma sala silenciosa e com pouca iluminação. Durante o experimento, cada rato foi cuidadosamente colocado dentro da caixa, de frente para a parede posterior, permanecendo no interior do aparato para livre exploração por 5 min. As variáveis registradas foram o número de cruzamentos nas linhas pretas e o comportamento de soerguimento, ou seja, o número de vezes em que o animal se colocou no plano vertical, apoiando-se somente sobre as patas traseiras para exploração do ambiente ^{122, 123}.



Figura 10 – Teste do campo aberto.

5.6.2.3 Teste do cilindro

O teste do cilindro, desenvolvido por Schallert e cols., foi utilizado para avaliar a assimetria das patas anteriores durante a exploração vertical em um cilindro transparente. O aparato constituiu-se de um cilindro transparente de 20 cm de diâmetro e 30 cm de altura. Cada animal foi colocado individualmente no cilindro e monitorado por vídeo por 5 min. Os seguintes comportamentos foram registrados: (1) uso independente (número de contatos) da pata anterior esquerda ou direita para contatar a parede do cilindro durante a elevação; (2) uso

simultâneo (número de contatos) das patas anteriores para contatar a parede do cilindro durante a elevação e nos movimentos laterais (Figura 11). Os resultados foram calculados pelo percentual do uso da pata anterior não prejudicada (ipsilateral, direita), em relação ao número total de movimentos e o percentual do uso da pata anterior prejudicada (contralateral, esquerda) em relação ao número total de movimentos. O escore de assimetria foi dado como a diferença entre o percentual do uso da pata anterior não-prejudicada (direita), do percentual do uso da pata anterior prejudicada (esquerda) para a exploração. Animais com menos de 10 movimentos foram excluídos da análise ^{124, 125}. A reação natural do animal é explorar para achar uma rota de escape; foram colocados 2 espelhos atrás do cilindro num ângulo de 45 a 135° para possibilitar a observação dos ratos quando não estarem de frente para câmara de vídeo. Este teste foi realizado para o grupo com hemorragia unilateral ^{126, 127}.

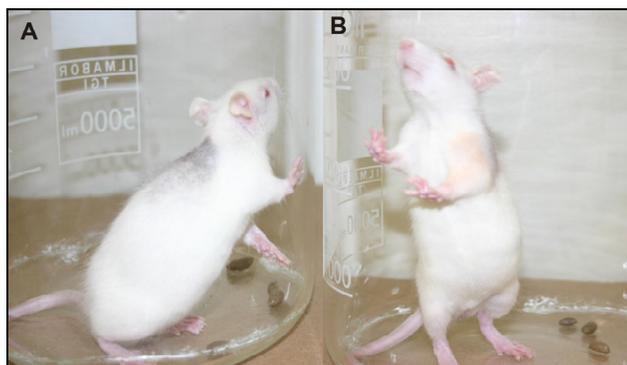


Figura 11 - Teste do cilindro. (A) Movimento independente da pata dianteira direita; (B) Movimento bilateral de ambas as patas anteriores.

5.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

No intuito de avaliar os efeitos da hemorragia neonatal sobre parâmetros morfométricos (anatômicos e histológicos) do encéfalo de ratos no P7 e P 30, alguns dos animais submetidos à avaliação da atividade neuromotora e cognitiva foram selecionados de forma aleatória para a realização de processamento histológico (hematoxilina-eosina). Estes animais foram divididos em dois grandes grupos de acordo com tempo pós-natal 7 dias (n=20) e 30 dias (n=25), que foram separados nos seguintes subgrupos: controle negativo, salina unilateral, colagenase unilateral, salina bilateral, colagenase bilateral, com n=4 para os subgrupos de P7 e n=5 para o subgrupo de P30.

Os animais foram anestesiados (i.p) com xilasina (0,1 mL/kg) e ketamina (0,1 mL/kg), logo após foram submetidos à toracotomia, em seguida foi injetada heparina (0,1 mL) no ápice cardíaco, no intuito de evitar a formação de coágulos. Os animais foram perfundidos transcárdialmente com solução salina seguida de formol 10% em 4°C, com a secção do átrio direito¹²⁸. Após a perfusão os encéfalos foram cuidadosamente retirados da caixa craniana nestes foi realizada uma análise macroscópica, com registro fotográfico e pesagem. Posteriormente foram pós-fixados e armazenados em formol 10% (1 a 7 dias).

A seguir, foram processados para a inclusão em parafina, na seguinte sequência: água corrente (1 hora), álcool (70%, 80%, 90%, 95%,100%) e xilol (5 min) e incluídos em parafina. Foram realizadas secções coronais seriadas do encéfalo (4 micrômetro; μm) em micrótomo (Leica RM 2125RT). Para as medidas de volume pelo método de Cavalieri foram coletadas secções equidistantes (100 μm entre cada fatia coletada)^{129, 130}. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas histológicas preparadas com poly-L-lysina, submetidos à técnica histológica de hematoxilina-eosina, cobertos com resina Dammar e lamínulas^{30:88}.

As estruturas do sistema nervoso central, área subependimária e ventrículos laterais foram identificados de acordo com o atlas de Paxinos & Watson¹³¹. Para calcular o volume encefálico (sem cerebelo) foram obtidas imagens digitalizadas das secções do encéfalo, sobre *grid* de pontos equidistantes, com 1 milímetro quadrado (mm^2), em lupa estereoscópica (modelo Stemi SVG-Zeiss) acoplada à câmera CCD e software de análise de imagens (Pixera View) (Figura 12).

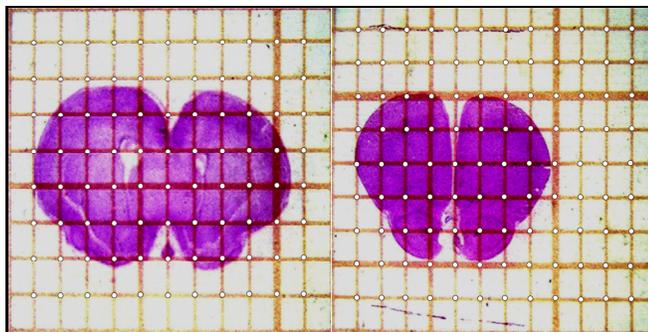


Figura 12 – Grid de pontos. Imagens digitalizadas, obtida em lupa estereoscópica, de secção coronal do encéfalo de ratos 4 μm , corados com a técnica de hematoxilina-eosina. Podemos observar o *grid* de pontos equidistantes (1 mm^2) em dois aumentos distintos. A área da secção é obtida pelo método de contagem dos pontos que se sobrepõem a imagem da secção

Após a análise qualitativa dos encéfalos, observou-se que a lesão nos animais que receberam collagenase era restrita às coordenadas Bregma 1.70 mm, Interaural 10.70 mm (Rostral) até as coordenadas Bregma -5.60, Interaural 3.40 (Caudal). Deste modo, no intuito de mensurar de forma mais fidedigna a possível lesão causada pela collagenase, em nosso

trabalho foi estimado o volume encefálico, pelo método de Cavalieri, compreendido entre estas coordenadas.

A estimativa do volume encefálico foi obtida de acordo com protocolos previamente descritos²⁵. A área de todas as secções histológicas foi mesurada pelo método de contagem de pontos, representada pela seguinte equação: $A = \Sigma p.a/p$. O volume encefálico analisado foi obtido pela seguinte equação: $V(est) = (\Sigma A.T)$, onde A =Área da secção; Σp = somatório de pontos; a/p = área ponto (1 mm^2); T = distância entre as secções ($100 \mu\text{m}$).

O coeficiente de encolhimento tecidual gerado pelo emblocamento em parafina e processamento histológico não foi possível de ser estimado. Deste modo, o material foi processado de modo mais uniforme possível, no intuito de que este coeficiente se tornasse homogêneo entre os grupos estudados. A análise morfométrica das imagens iniciou somente após a correlação total entre as contagens analisadas pelo pesquisador experiente com os dados do pesquisador responsável por este projeto. As imagens foram codificadas de modo que o pesquisador não tivesse conhecimento sobre a que grupo pertencia.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar os testes geotaxia negativa e reflexo de endireitamento utilizou-se análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste *Bonferroni*. Para os testes de ambulação foi utilizada teste de *Kruskal-Wallis*. Para calcular o volume, cilindro, campo aberto e preensão das patas anteriores utilizou-se ANOVA de uma via seguido do teste de *Tukey* ou teste de *Games-Howell*. Para análise dos dados obtidos nos testes cognitivos (reconhecimento de objetos) utilizou-se o teste t de *Student* simples para amostras pareadas. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão para variáveis quantitativas de distribuição normal. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas através de *software* estatístico SPSS versão 15,0.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Balasubramaniam J, Del Bigio MR. Animal models of germinal matrix hemorrhage. *J Child Neuro*2006 May; 21(5):365-71.
 2. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*1979 Mar;3(1):79-83.
 3. Roohey T, Raju TN, Moustogiannis AN. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a critical analysis. *Early Hum Dev*1997 Jan 20;47(2):115-46.
 4. Vannucci RC, Connor JR, Mauger DT, Palmer C, Smith MB, Towfighi J, et al. Rat model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *J Neurosci Res*1999 Jan 15;55(2):158-63.
 5. Nan Z, Grande A, Sanberg CD, Sanberg PR, Low WC. Infusion of human umbilical cord blood ameliorates neurologic deficits in rats with hemorrhagic brain injury. *Ann N Y Acad Sci*2005 May;1049:84-96.
 6. MacLellan CLD, LM; Fingas, MS; Colbourne, F. The influence of hypothermia on outcome afetr intracerebral hemorrhagea in rats. *Stroke*2006;37:1267-70.
 7. Rhoden L, Rhoden, RC. Princípios e Técnica em Experimentação Animal. Rio Grande do Sul2006.
 8. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*1990 May;21(5):801-7.
 9. Cherian SS, Love S, Silver IA, Porter HJ, Whitelaw AG, Thoresen M. Posthemorrhagic ventricular dilation in the neonate: development and characterization of a rat model. *J Neuropathol Exp Neurol*2003 Mar;62(3):292-303.
 10. Chesney JA, Kondoh T, Conrad JA, Low WC. Collagenase-induced intrastriatal hemorrhage in rats results in long-term locomotor deficits. *Stroke*1995 Feb;26(2):312-6; discussion 7.
 11. Rotstein M, Bassan H, Kariv N, Speiser Z, Harel S, Gozes I. NAP enhances neurodevelopment of newborn apolipoprotein E-deficient mice subjected to hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther*2006 Oct;319(1):332-9.
 12. Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav*1965 Apr-Jul;13(2):234-41.
-

-
13. Balasubramaniam J, Xue M, Buist RJ, Ivanco TL, Natuik S, Del Bigio MR. Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. *Exp Neurol* 2006 Jan;197(1):122-32.
 14. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988 Nov 1;31(1):47-59.
 15. Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH, Izquierdo I. Stress hormones enhance retrieval of fear conditioning acquired either one day or many months before. *Behav Pharmacol* 2002 May;13(3):203-13.
 16. Lubics A, Reglodi D, Tamas A, Kiss P, Szalai M, Szalontay L, et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res* 2005 Feb 10;157(1):157-65.
 17. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2000 Mar 3;39(5):777-87.
 18. Vendrame M, Gemma C, de Mesquita D, Collier L, Bickford PC, Sanberg CD, et al. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev* 2005 Oct;14(5):595-604.
 19. Gulley JM. Individual differences in novelty- and cocaine-induced locomotor activity as predictors of food-reinforced operant behavior in two outbred rat strains. *Pharmacol Biochem Behav* 2007 Apr;86(4):749-57.
 20. Schallert T, Leasure JL, Kolb B. Experience-associated structural events, subependymal cellular proliferative activity, and functional recovery after injury to the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000 Nov;20(11):1513-28.
 21. MacLellan CL, Silasi G, Poon CC, Edmundson CL, Buist R, Peeling J, et al. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008 Mar;28(3):516-25.
 22. Avendano C, Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E. Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. *Brain Res* 1995 Feb 27;673(1):83-92.
 23. Rodrigues AL, Arteni NS, Abel C, Zylbersztejn D, Chazan R, Viola G, et al. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res* 2004 Mar 26;1002(1-2):94-9.
 24. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 25 Borlongan CV, Hadman ed. Sydney: Academic Press; 1986.
-

25. Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Da Cunha C, Deonizio JM, Netto CA, et al. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Protoc* 2005 Dec;16(1-3):58-64.

CAPÍTULO III

Artigo Original

(Artigo em fase de tradução para a língua inglesa a ser submetido para a revista

Journal of Neuropathology & Experimental Neurology)

Desenvolvimento de um modelo experimental de hemorragia subependimária-intraventricular em ratos recém-nascidos

Yanet Chong Juárez Alles^a, Léder Leal Xavier^a, Pâmella Nunes Azevedo^a, Raul Miguel

Alles^b, Jaderson Costa Dacosta^{a,*}

^a *Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.*

^b *Unidade de Saúde Comunitária, Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, RS, Brasil.*

* Autor correspondente:

Jaderson C. Dacosta, MD, PhD.

Laboratório de Neurociências, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6690, Jardim Botânico, Prédio 60, 2º andar, sala 07, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone: +5551 33202173

Fax: +5551 33203312

E-mail: jcc@pucrs.br

Introdução

A hemorragia subependimária-intraventricular, também chamada de hemorragia da matriz germinativa, ocorre em 40-50% dos recém-nascidos (RNs) com menos de 26 semanas e aproximadamente em 20% entre os RNs com 26-34 semanas de gestação. Aproximadamente 15% dos nascimentos são pré-termos (<37 semanas) e 2% pré-termos extremos (<31 semanas)¹⁻³. A sua incidência e magnitude são inversamente proporcionais à IG⁴.

A hemorragia subependimária-intraventricular (HS-HIV) é causa mais frequente de hemorragia intracraniana, entre a população de pré-termos⁴. Esta é uma complicação comum, sendo associada a altas taxas de mortalidade; podendo evoluir com hidrocefalia pós-hemorrágica e sequelas neurológicas severas.

A matriz germinativa localiza-se adjacente ao ventrículo lateral, especialmente na eminência ganglionar. A patogênese da hemorragia é multifatorial e consiste em uma combinação de variações do fluxo sanguíneo das vênulas e arteríolas, do distúrbio de coagulação, da fragilidade da parede do vaso e de uma intensa atividade fibrinolítica do tecido cerebral imaturo^{3, 5, 6}. A hemorragia pode causar lesão tecidual e destruição, seguidas por um dano secundário da atividade proteolítica envolvendo a formação de coágulos, bem como lise, inflamação, produção de citocinas, edema e lise eritrocitária^{7, 8}. A sua gravidade depende da extensão da hemorragia. Assim temos a classificação de Papile, que correlaciona o sangramento em graus dependendo se este ocorreu no ventrículo ou fora e se houve aumento do mesmo.⁹ Estudos de imagens, especialmente a ultrassonografia transfontanelar, é a principal ferramenta para o diagnóstico de hemorragia^{2, 10}. A evolução a longo prazo dos neonatos portadores de hemorragia intracraniana é preocupante, do ponto de vista neurológico. Os graus mais avançados de hemorragia estão associados à ocorrência de sequelas motoras, em especial a hemiparesia espástica, e de sequelas cognitivas, por diminuição do número de axônios, dendritos, neurônios, mielina e sinapses, que tem como resultado a limitação do desenvolvimento das crianças, ou seja, deterioração intelectual, convulsões, cegueira e surdez¹¹⁻¹³. Tudo isto exige o uso intensivo de um grupo de atendimento multidisciplinar. A hemorragia está associada a retardo mental e hidrocefalia^{2, 14}.

Atualmente, na busca de métodos para o reparo de problemas hemorrágicos cerebrais, a necessidade de se entender sua patogenia e o comportamento das lesões têm impulsionado a maiores investigações através dos modelos experimentais de hemorragia. Através de um estudo experimental de hemorragia subependimária-intraventricular, hipotetizamos que a

utilização de colagenase como causador da hemorragia em ratos recém-nascidos possa servir de modelo para futuras descobertas terapêuticas e acompanhamento das mesmas.

Existem determinadas espécies de animais que são utilizadas para avaliar terapias ou a fisiopatologia da hemorragia, que incluem roedores, cães (*beagle*), gatos, porcos, coelhos, macacos e ovelhas. Ratos, camundongos e cães são os animais mais comumente usados em modelos de hemorragia intracraniana⁴, sendo que o desenvolvimento do cérebro dos roedores recém-nascidos é comparável com 24-26 semanas do humano¹⁵. Balasubramaniam e colaboradores desenvolveram um modelo de hemorragia subependimária injetando sangue autólogo dentro da região periventricular do cérebro de camundongos e ratos com 1 dia de vida demonstrando uma significativamente diminuição na proliferação celular^{14, 16}.

Um método amplamente conhecido que produz hemorragia intracraniana dá-se através da injeção de colagenase (tipo IV, VII, IX), dentro do gânglio basal do cérebro, que foi primeiramente introduzido por Rosenberg e colaboradores, em ratos e, após, subsequentemente estudado em camundongos¹⁷. Esta enzima digere o colágeno presente na lâmina basal dos vasos sanguíneos e causa sangramento no tecido cerebral. Balasubramaniam e colaboradores demonstraram que a colagenase causa significantes reações inflamatórias e outros prováveis mecanismos, que então produzem hemorragia intracraniana em humanos.¹⁸. Logo, então, hipotetizamos que a colagenase tipo VII possa também produzir hemorragia subependimária-intraventricular em ratos recém-nascidos, sendo possível os avaliar através de testes neuromotores e cognitivos bem como analisar as alterações macro e microscópicas, após o insulto hemorrágico.

Materiais e métodos

Animais

O modelo experimental de hemorragia subependimária foi realizado com ninhadas de ratos *Wistar*. Ratas *Wistar* prenhas provenientes do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) foram mantidas no alojamento para animais do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (IPB-PUCRS), onde permaneceram em ambiente climatizado ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro-escuro de 12 em 12 h, com água e ração *ad libitum*. O dia do nascimento dos animais foi registrado pela pesquisadora e foi dado como o dia pós-natal 1 (P1). Aos 21 dias de vida, foi realizado o desmame dos animais.

Aspectos éticos

Este estudo seguiu os protocolos experimentais conforme normas internacionais e nacionais de experimentação com animais de laboratório. Estes receberam cuidados adequados, tendo sido submetidos ao mínimo de desconforto possível e de “*stress*”, com o menor número de animais utilizados. Em todos os procedimentos a que os animais foram submetidos à sedação e analgesia de acordo com a necessidade, para evitar o seu sofrimento. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, registro CEP 07/03955.

Modelo experimental de Hemorragia periventricular

Realizou-se um estudo para o desenvolvimento de um modelo experimental de hemorragia subependimária-intraventricular em ratos recém-nascidos, no período de março de 2007 a dezembro de 2008. O estudo foi experimental controlado e cego para o procedimento realizado durante as análises e acompanhado por 30 dias. A pesquisa foi dividida em três fases experimentais: fase I, para o estabelecimento do modelo de hemorragia subependimária-intraventricular; fase II, para avaliação da repercussão neuromotora; fase III, para avaliação histológica do encéfalo.

A pesquisa foi realizada no IPB-PUCRS, que apresenta uma estrutura tecnológica básica onde foi desenvolvido este projeto, realizado em 3 centros: o Centro de Memória, o Centro de Gerontologia Molecular e Funcional e o Laboratório de Neurociências.

Fase I – Estabelecimento do modelo de hemorragia subependimária-intraventricular

Estudo Piloto

Para o desenvolvimento do modelo de hemorragia a partir da matriz germinativa, foi organizado um grupo piloto a fim de se determinar o local exato e a quantidade de colagenase que poderia provocar hemorragia subependimária-intraventricular, através de *freehand* injetando azul de metileno. Para isto foi utilizada a distância orelha-olho para determinar a coordenada da região subependimária, dividida em três subgrupos com a distância orelha-olho: 1 mm (n=3), 2 mm (n=3), 3 mm (n=3) e com profundidade de 1 mm, 2 mm e 3 mm. Para determinar a quantidade de colagenase foram testadas dosagens de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 Unidades (U) de colagenase com n=3,0 para cada concentração. Chegou-se à conclusão de que 2 U de colagenase tipo VII provocariam hemorragia da matriz germinativa, sendo esta determinada pela macroscopia e histologia ¹⁹.

Estudo experimental

O estudo experimental constou de 2 grupos: (1) Hemorragia unilateral; (2) Hemorragia bilateral. Dentro destes grupos existiram mais 3 subgrupos, a saber, controle negativo, salina e colagenase. Na hemorragia unilateral o subgrupo constava de controle negativo n=12, salina n=12 colagenase n=12. Na hemorragia bilateral o subgrupo era salina n=10 e colagenase n=9. Estes grupos realizaram os testes neuromotores e cognitivos. Foram utilizadas 2 ninhadas para provocar hemorragia unilateral e bilateral e observar macroscópica e histologicamente as alterações provocadas no P7. Os subgrupos foram controle negativo (n=4), grupo salina (n=4) e o colagenase (n=4), para hemorragia unilateral e bilateral.

Os filhotes eram pesados e após colocados sobre um lençol térmico para manter a temperatura. Após, foram anestesiados com halotano através de uma máscara anestésica ²⁰. Colocados na posição ventral com as patas posteriores e anteriores em extensão, a cabeça era fixada com a mão esquerda do pesquisador e puncionada com a mão direita na região lateral a 2 mm para frente da orelha direita, numa linha imaginária horizontal da orelha ao olho e introduziu-se uma agulha número 27 G com 3 mm de profundidade, previamente já marcada. O conteúdo da agulha era de 2 U de colagenase tipo VII (*Sigma Chemical Co.*) injetado através de uma seringa Hamilton (de 5µL) em 2 µL de solução salina na região subependimária-intraventricular. E para o grupo salina eram injetados 2 µL de soro fisiológico. Para o grupo controle negativo não era feito nada a não ser pesagem. Após a introdução da agulha, esperava-se 2 min para a retirada cuidadosa, para evitar sangramento

extra, pela retirada abrupta da mesma, conforme estudos anteriores com estereotaxia^{19, 21}. Os animais ficaram em observação sob luz aquecida por 10-15 min após o procedimento, quando então foram devolvidos às suas caixas com suas respectivas mães. Os animais foram desmamados no P21, quando então eram separados da mãe e colocados em caixas separadas. No grupo 2, para produzir a hemorragia bilateral foram seguidos os mesmos procedimentos da hemorragia unilateral, entretanto, também era feito o procedimento no lado esquerdo, empregando-se a mesma técnica.

Fase II para avaliação da repercussão neuromotora

Avaliação comportamental e neuromotora

Os animais foram avaliados após 24 h do procedimento, no P7, P11, P15 e P30. Estes testes incluíram avaliação de reflexos neonatais: reflexo de endireitamento (*surface rigthing*), geotaxia negativa (*negative geotaxis*) e preensão das patas anteriores (*forelimb grip* testes de atividades neuromotoras: ambulação (*ambulation*); teste do campo aberto (*open field*); teste do cilindro e avaliação de reconhecimento de objetos^{20, 22}.

O reflexo de endireitamento (*surface rigthing*) consistia no posicionamento do filhote sobre uma superfície. Foi colocado delicadamente virado de costas sobre uma superfície plana. O tempo para retornar à posição de pé era registrado. A duração do tempo era limitada a 2 min. Esse testes foi realizado três vezes e após calculada a média no P7, P11, P15^{18, 22}.

A geotaxia negativa (*negative geotaxis*) reflete a preferência dos filhotes por olhar para cima numa superfície inclinada. Os filhotes foram colocados com a cabeça para baixo numa superfície inclinada a 25°. Foram mantidos nessa posição com cuidado por aproximadamente 5 segundos antes de serem soltos. O tempo para a posição de face foram registrados. O tempo máximo foi de 2 min. Repetiu-se o teste 3 vezes e após foi calculada uma média. Foi realizado no P7, P11 e P15¹⁸.

O teste de ambulação (*ambulation*) foi realizado no P7, P11 e P15 e consistiu em observar por 5 min, sobre uma superfície plana de madeira de 50X50 cm, os movimentos dos filhotes. Os movimentos foram qualificados com a seguinte pontuação: sem movimento=0; movimentos assimétricos das patas=1; arrastando lentamente as patas=2; e caminhada rápida=3¹⁸.

O teste que avaliou a pressão das patas anteriores (*forelimb grip*) foi realizado no P11 e P15, com um pedaço de arame com diâmetro de 1,5 mm, 70 cm de comprimento entre dois postes a uma altura de 40 cm com uma esponja macia entre os dois postes, para o filhote não

se machucar. Foi medido o tempo de queda, estipulando como tempo máximo de 2 min. Ou seja, quanto mais rápida a queda, mais lesado estava o animal¹⁸.

Avaliações das funções exploratória e cognitivas

Os filhotes permaneceram com a mãe até os 21 dias, após ocorreu o desmame, sendo avaliados no P30 por três testes: teste do reconhecimento de objetos; exploração do campo aberto, teste do cilindro, baseados em estudos prévios. Todos os testes necessários para reavaliação foram gravados e após foram vistos por 2 avaliadores cegos.

Paradigma de reconhecimento de objetos

Para realização do paradigma de reconhecimento de objetos foi iniciado a habituação dos animais, com mais ou menos 26 dias de vida. O paradigma de reconhecimento de objetos utiliza a tendência natural que os roedores têm de explorar objetos novos para medir sua memória²³. A tarefa consiste em um treino no qual são apresentados dois objetos, seguido de um teste em que um dos objetos introduzidos durante o treino é substituído por um objeto novo. Roedores sem lesão tendem a explorar o objeto novo por mais tempo, demonstrando assim memória do objeto familiar.

Para estes experimentos, os animais foram expostos a um campo aberto (60x40x50 cm, comprimento x profundidade x altura), feito de madeira, com frente de vidro durante, 20 min, por 4 dias consecutivos para habituação, na ausência de objetos. O experimento foi realizado em uma sala silenciosa e com pouca iluminação. No quinto dia, foram dispostos no campo aberto, de maneira equidistante, dois objetos que diferiam entre si quanto à sua cor, altura, formato e textura, presos ao campo aberto pela base. Foram consideradas atividades exploratórias do animal: farejar o objeto ou tocá-lo com as patas dianteiras ou focinho, mas não virar o objeto ou sentar-se nele, nem ficar com as quatro patas sobre o objeto. Durante o treino, os animais foram colocados no campo aberto durante 5 min. O tempo percentual gasto explorando cada objeto foi calculado e expresso como percentual do tempo total de exploração em segundos. Os observadores eram cegos quanto aos grupos.

O teste de retenção foi feito 24 h após a sessão de treino. Durante este teste, os animais foram novamente colocados no campo aberto, onde um dos objetos foi previamente trocado por outro com características de cor, formato, textura e alturas diferentes, e o tempo percentual gasto explorando cada objeto foi novamente calculado com intuito de avaliar a memória de longa duração. Durante o teste os animais permaneceram no campo aberto durante o mesmo tempo (5 min) do treino.

A atividade locomotora e o comportamento exploratório foram avaliados através da tarefa comportamental campo aberto (*open field*). O aparato dessa avaliação constituiu-se de uma caixa de madeira compensada com dimensões de 60 x 40 cm, circundada por paredes altas de 50 cm e uma parede frontal de vidro transparente, possibilitando a observação do avaliador. O assoalho do campo aberto foi dividido em 12 áreas iguais por linhas pretas. Os animais foram colocados na sala de experimentação após 24 h do teste do reconhecimento de objeto, previamente já aclimatizados antes da realização do teste. O experimento foi realizado em uma sala silenciosa e com pouca iluminação. Durante o experimento, cada rato foi cuidadosamente colocado dentro da caixa, de frente para a parede posterior, permanecendo no interior do aparato para livre exploração por 5 min. As variáveis registradas foram o número de cruzamentos (*crossing*) nas linhas pretas e o comportamento de soerguimento (*rearing*), ou seja, o número de vezes em que o animal se colocou no plano vertical, apoiando-se somente sobre as patas traseiras para exploração do ambiente²⁴.

O teste do cilindro, desenvolvido por Schallert e col., foi utilizado para avaliar a assimetria das patas anteriores durante a exploração vertical em um cilindro transparente. O aparato constituiu-se de um cilindro transparente de 20 cm de diâmetro e 30 cm de altura. Cada animal foi colocado individualmente no cilindro e monitorado por vídeo por 5 min. Os seguintes comportamentos foram registrados: (1) uso independente (número de contatos) do membro anterior esquerdo ou direito para contatar a parede do cilindro durante a elevação; (2) uso simultâneo (número de contatos) das patas anteriores para contatar a parede do cilindro durante a elevação e nos movimentos laterais. Os resultados foram calculados pelo percentual do uso da pata anterior não prejudicada (ipsilateral, direita), em relação ao número total de movimentos e o percentual do uso da pata anterior prejudicada (contralateral, esquerda) em relação ao número total de movimentos. O escore de assimetria foi dado como a diferença entre o percentual do uso da pata anterior não-prejudicada (direita), do percentual do uso da pata anterior prejudicada (esquerda) para a exploração. Animais com menos de 10 movimentos foram excluídos da análise^{25,26}. A reação natural do animal é explorar para achar uma rota de escape; foram colocados 2 espelhos atrás do cilindro num ângulo de 45 a 135° para possibilitar a observação dos ratos quando não estiverem frente para câmara de vídeo¹⁸.

Avaliação histológica

No intuito de avaliar os efeitos da hemorragia neonatal sobre parâmetros morfométricos (anatômicos e histológicos) do encéfalo de ratos no P7 e P30, alguns dos animais submetidos à avaliação da atividade neuromotora e cognitiva foram selecionados de

forma aleatória para a realização de processamento histológico (hematoxilina-eosina). Estes animais foram divididos em dois grandes grupos de acordo com tempo pós natal 7 dias (n=20) e 30 dias (n=25), que foram separados nos seguintes subgrupos: controle negativo, salina unilateral, colagenase unilateral, salina bilateral, colagenase bilateral, com n=4 para os subgrupos de P7 e n=5 para o subgrupo de P30.

Os animais foram perfundidos com solução salina seguida de formol 10% em 4°C. Após a perfusão os encéfalos foram cuidadosamente retirados da caixa craniana nestes foi realizada uma análise macroscópica, com registro fotográfico e pesagem. Posteriormente foram pós-fixados e armazenados em formol 10% (1 a 7 dias). A seguir, foram processados para a inclusão em parafina. Foram realizadas secções coronais seriadas do encéfalo (4µm) em micrótomo (Leica RM 2125RT). Para as medidas de volume pelo método de Cavalieri foram coletadas secções equidistantes (100µm entre cada fatia coletada). Os cortes obtidos foram colocados em lâminas histológicas preparadas, submetidos à técnica histológica de hematoxilina-eosina^{18, 27}.

As estruturas do sistema nervoso central, área subependimária e ventrículos laterais foram identificados de acordo com o atlas de Paxinos & Watson²⁸. Para calcular o volume encefálico (sem cerebelo) foram obtidas imagens digitalizadas das secções do encéfalo, sobre *grid* de pontos equidistantes, com 1 mm², em lupa estereoscópica (modelo *Stemi SVG-Zeiss*) acoplada a câmera CCD e *software* de análise de imagens (Pixera View).

Após a análise qualitativa dos encéfalos, observou-se que a lesão nos animais que receberam colagenase era restrita às coordenadas Bregma 1.70 mm, Interaural 10.70 mm (Rostral) até as coordenadas Bregma -5.60, Interaural 3.40 (Caudal). Deste modo, no intuito de mensurar de forma mais fidedigna a possível lesão causada pela colagenase, em nosso trabalho foi estimado o volume encefálico, pelo método de Cavalieri, compreendido entre estas coordenadas.

A estimativa de volume encefálico foi obtida de acordo com protocolos previamente descritos^{29, 30}. A área de todas as secções histológicas foi mesurada pelo método de contagem de pontos, representada pela seguinte equação: $A = \Sigma p.a/p$. O volume encefálico analisado foi obtido pela seguinte equação: $V(est) = (\Sigma A.T)$, onde A=Área da secção; Σp = somatório de pontos; a/p= área ponto (1mm²); T= distância entre as secções (100µm). A análise morfométrica das imagens iniciou somente após a correlação total entre as contagens analisadas pelo pesquisador experiente com os dados do pesquisador responsável por este

projeto. As imagens foram codificadas de modo que o pesquisador não tivesse conhecimento sobre a que grupo pertencia.

Análise estatística

Para avaliar os testes geotaxia negativa e reflexo de endireitamento utilizou-se análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida do teste *Bonferroni*. Para os testes de ambulação foi utilizada teste de *Kruskal-Wallis*. Para calcular o volume, cilindro, campo aberto e apreensão das patas anteriores utilizou-se ANOVA de uma via seguido do teste de *Tukey* ou teste de *Games-Howell*. Para análise dos dados obtidos nos testes cognitivos (reconhecimento de objetos) utilizou-se o teste t de *Student* simples para amostras pareadas. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão para variáveis quantitativas de distribuição normal. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas através de *software* estatístico SPSS versão 15,0.

Resultados

Estabelecimento do modelo

Ao estabelecer o modelo de hemorragia subependimária-intraventricular através da técnica de *freehand* observamos que, com 2U de colagenase tipo VII, conseguimos provocar hemorragia, sendo esta constatada por microscopia e histologia. Tivemos 6 óbitos durante as tentativas de provocar a hemorragia com a colagenase e 8 óbitos quando se estava determinando as coordenadas (Figuras 1 e 2).

Testes Neuromotores

Na avaliação do escore de ambulação para hemorragia unilateral tivemos uma significância de $p < 0,0001$. No P7 no grupo controle *versus* colagenase o desempenho foi maior neste primeiro sendo, estatisticamente significativo $p < 0,001$. No P11 o desempenho do grupo controle negativo e salina foi melhor que a colagenase sendo $p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente, o escore foi maior nestes grupos. Quando analisamos o P15 observamos que os três grupos tiveram um desempenho parecido sem diferença significativa entre eles (Figura 3A). O escore de ambulação para hemorragia bilateral teve uma significância $p < 0,0001$. No P7 observou-se que o grupo controle negativo e salina foi melhor que o grupo da colagenase mostrando significância estatística de $p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente. No dia P11 encontramos que o controle negativo e salina tiveram também melhor desempenho com um $p < 0,001$. E quando avaliamos no P15 ambos grupos com, hemorragia unilateral e bilateral não encontramos diferença significativa. (Figura 3B).

Na avaliação do reflexo de endireitamento com hemorragia subependimária-intraventricular unilateral tivemos uma significância de $p < 0,001$. No P7 ao comparar o controle negativo *versus* colagenase observamos que o primeiro foi mais rápido em realizar a tarefa de endireitamento com um $p < 0,01$, com o passar dos dias os três grupos no P11 e no P15 foram parecidos em tempo para realizar a mesma tarefa (Figura 4A). Na hemorragia bilateral tivemos uma significância de $p < 0,0001$. O grupo com colagenase demorou mais para realizar as mesmas tarefas nos tempos P7, P11 e P15 ($p < 0,05$; $p < 0,05$ e $p < 0,001$) quando comparado com o controle negativo. E quando comparada salina com colagenase no P11 teve pior desempenho $p < 0,05$. E soro fisiológico com controle no P15 $p < 0,05$ (Figura 4B).

Para avaliação do teste geotaxia negativa na hemorragia unilateral pode-se evidenciar que não ocorreu diferença significativa entre os três grupos (Figura 5A). Na hemorragia bilateral encontramos uma significância de $p < 0,001$. No P7 observamos que o grupo controle

negativo e salina foi mais rápido em realizar a tarefa com uma significância de $p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente (Figura 5B).

Com respeito ao teste de preensão das patas anteriores na hemorragia unilateral não houve diferença significativa no P11 $p = 0,692$ e no P15 $p = 0,456$ (Figura 6A). Na hemorragia bilateral não houve diferença no P11 $p = 0,339$ e no P15 teve diferença significativa $p = 0,045$. Após foi utilizado um teste post hoc para hemorragia bilateral no P15 (*teste de Games-Howell*), mostrando que não houve diferença entre os grupos ($p = 0,074$ em relação ao grupo salina e $p = 0,070$ em relação ao grupo controle negativo) (Figura 6B). O teste do cilindro para os animais com hemorragia subependimária-intraventricular unilateral não mostrou significância estatística ($p = 0,302$) (Figura 7).

Com o objetivo de analisar a memória de reconhecimento após a hemorragia da matriz germinativa, os animais foram treinados na tarefa de reconhecimento de objetos no P30. Os testes foram realizados tanto para os com hemorragia unilateral quanto para aqueles com hemorragia bilateral. No grupo controle negativo observamos que o objeto novo foi mais explorado e reconhecido como tal com significância estatística ($p = 0,007$) (Figura 8A). O grupo salina explorou, durante o treino, os objetos por igual e, no dia do teste, exploraram mais o objeto novo, reconhecendo este como tal, mas não sendo significativo ($p = 0,11$) (Figura 8B). Na hemorragia unilateral observou-se que o grupo colagenase, durante o treino, explorou os dois objetos iguais e, no dia do teste, também explorou os dois objetos, o novo e o antigo igualmente ($p = 0,95$) (Figura 8C). Ao analisarmos os grupos com lesão bilateral, encontramos que o grupo com colagenase e grupo salina não foram estatisticamente significativo $p = 0,20$ e $p = 0,48$. (Figura 9).

Após 24 h do teste cognitivo, iniciou-se o teste de campo aberto. Na Tabela 1 encontramos que não houve diferença significativa entre os grupos para hemorragia unilateral ($p = 0,098$ para soerguimento e $p = 0,160$ para cruzamento). Na Tabela 2 constatamos que houve diferença significativa entre os grupos com hemorragia bilateral ($p = 0,012$ para soerguimento e $p = 0,012$ para cruzamento).

Resultados da avaliação histológica

Nos grupos controle negativo (P7 e P30) não foi observada nenhuma alteração morfológica nítida, tanto em termos estruturais do parênquima quanto no tamanho e forma prevista para os ventrículos (Figura 10).

Na observação dos grupos salina (P7 e P30), estes foram idênticos ao grupo controle, salvo o fato que em um animal do grupo salina bilateral foi encontrado um cisto na região das

fimbrias do hipocampo, provavelmente gerado por infiltração do soro fisiológico (Figura 11 e 12).

Na avaliação qualitativa da lesão na hemorragia unilateral (P7), observamos ventriculomegalia e extravasamento de hemácias para dentro do ventrículo e parênquima cerebral no hemisfério direito, desde as coordenadas Bregma: 0,70 mm. Interaural: 9,70 mm (Rostral) até as coordenadas Bregma:- 3,30 mm Interaural: 5,70 mm (Caudal) (Figura 13 e 14).

A hemorragia bilateral no P7 foi observada em ambas regiões, periventricular e ventricular, com extravasamento de hemácias para dentro e fora do ventrículo; sendo que a lesão e a observação de áreas necróticas do parênquima estendeu-se bilateralmente até o hipocampo, mais especificamente entre as coordenadas Bregma 1,70 mm, Interaural 10,70 mm (Rostral) até as coordenadas Bregma -5,60, Interaural 3,40 (Caudal) (Figura 15).

Na avaliação quantitativa da hemorragia subependimária-intraventricular no P6, 24 h após o procedimento de indução de hemorragia intracraniana, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,0169$). Na comparação entre os grupos, observamos uma redução de volume encefálico nos grupos que receberam colagenase unilateral, em relação ao grupo salina unilateral e colagenase bilateral, em relação aos grupos controle e aos grupos salina unilateral e bilateral ($p < 0,05$) (Figura 16A).

Na avaliação do volume encefálico nos animais P30 observamos uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,0049$), sendo que os animais que receberam colagenase unilateral e bilateral apresentaram um volume encefálico significativamente menor, quando comparados aos animais controle, $p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente (Figura 16B).

Discussão

Um modelo de hemorragia deve ter idealmente a capacidade de reproduzir a morfologia do que ocorre em humanos; deve ser reproduzível no mesmo local e deve ser suportável para os animais em experimentação. Além disto, os animais escolhidos para o estudo devem ser de rápida reprodutividade, ter facilidade de se manter em ambiente neutro para a espécie e, sobretudo, ser de fácil manejo para reproduzir o modelo. Pelos motivos descritos anteriormente é que escolhemos o grupo de ratos *Wistar*, para realizar nosso modelo de hemorragia subependimária-intraventricular. Na literatura, existem outros modelos de hemorragia subependimária-intraventricular, com outros animais, que conseguiram com que a matriz germinativa sangrasse através de procedimentos diferentes que não a colagenase (gatos, cães, macacos, coelhos), mas que exigiriam outros locais para manutenção e, em alguns casos, a sua reprodutividade é menor³¹⁻³⁴.

Em nosso estudo, desenvolvemos um modelo de hemorragia subependimária-intraventricular, com injeção de colagenase na matriz germinativa de ratos recém-nascidos no P6. Os animais do grupo experimental foram submetidos a um modelo de lesão cerebral de hemorragia da matriz germinativa, não existindo na literatura modelo experimental em que a matriz germinativa sangre para ratos recém-nascidos com P6 dias de vida, com a utilização de colagenase tipo VII. Só está descrita na literatura a injeção de sangue autólogo dentro do ventrículo ou periventricular, com ou sem fibrinolíticos na matriz germinativa para ratos recém-nascidos^{8, 18, 27}. Em ratos adultos existem pesquisas provocando (com peso de 200-350 gramas) a hemorragia em outra área do cérebro com colagenase tipo VII, IV^{17, 19, 35-37}.

O desenvolvimento do cérebro de ratos com sua anatomia e fisiologia é bem documentado na literatura. O rato, ao nascer, representa 24-26 semanas no humano e cada dia de vida representa 1 semana, conforme já estudado há décadas por Dobbing e Sands (1979). Outro estudo de Romijn considera que o rato com 12-13 dias de vida é comparável ao recém-nascido a termo³⁸. Hoje sabe-se que o rato recém-nascido apresenta uma camada de capilares muito incipientes envoltos por uma membrana basal, cujo conteúdo consiste de um tipo especial de colágeno e outras glicoproteínas³⁹⁻⁴¹. Logo, então, é importante diferenciar entre o desenvolvimento do cérebro do rato e do humano. Em humanos, a neurogênese é completada com 22 semanas, a migração neuronal com 26 semanas e a proliferação celular glial tem um pico aos 3-4 meses de idade^{15, 42, 43}. Em ratos, a neurogênese e o pico de migração neuronal acontece antes do nascimento prolongando-se até uns poucos dias após. A proliferação de células gliais no rato é mais intensa de P1 a P20. A sinaptogênese em humanos ocorre dos 2

meses-3 anos de idade, ao passo que a mielinização ocorre desde o nascimento até uns poucos anos do período pós-natal. No rato, a sinaptogênese em média ocorre de P14 a P21 e a mielinização de P10 a P50²⁷. Tudo isto é importante para se poderem determinar as possíveis alterações, os testes a serem utilizados, o local da injeção e também os dias de vida a serem aplicados os testes.

Em nosso estudo conseguimos provocar hemorragia subependimária-intraventricular, de maneira efetiva, somente com uma concentração de colagenase maior (2U) que a utilizada com ratos adultos, que é de 0,1-1.0 U^{17,44}. Isto talvez fosse necessário devido ao fato de que a quantidade de colágeno no rato adulto seja bem maior que no rato recém-nascido^{39, 45}. Alcançamos reproduzir a hemorragia com colagenase tipo VII, em recém-nascidos, já também utilizada por outros estudos em ratos adultos^{19, 35}. Foi possível visualizar macroscópica e histologicamente a lesão provocada pela colagenase, tanto na hemorragia unilateral quando na bilateral.

A enzima colagenase hidrolisa o colágeno presente na membrana basal dos capilares e causa sangramento no parênquima cerebral, podendo estender-se ao ventrículo cerebral. A imobilização de roedores em aparelhos de estereotaxia é problemática por necessitar de mais tempo de procedimento, o que aumenta a mortalidade. Por tudo isto se torna necessário outros métodos que não a estereotaxia para produzir lesão ou injetar medicação. Assim, temos que, Mengzhou e col. 2003, utilizaram em camundongos o método de *freehand* após controle com ressonância magnética¹⁴.

Na presente pesquisa, após estudo piloto em que desenvolvemos a técnica de *freehand* com o estabelecimento das coordenadas referentes ao alvo (matriz germinativa) e controle histológico, iniciamos os grupos de estudo. Observamos algumas alterações nos testes de ambulação, reflexo de endireitamento e geotaxia negativa, que são testes do desenvolvimento neuromotor dos ratos. A quantidade do sangramento e a área atingida, em nosso estudo, era a matriz germinativa, que vai ter correlação com a severidade da lesão e o déficit funcional⁴⁶. Conseguimos através dos testes, observar que à medida que o filhote ficava com mais dias de vida, após a injúria cerebral, o desempenho nos testes era melhor. Já com o teste de preensão das patas anteriores, nos filhotes com hemorragia unilateral, não encontramos diferença significativa quando a hemorragia era provocada de um lado só, semelhantemente a outros estudos, e isto se deve talvez à compensação do membro oposto⁴⁷. Ao testar a preensão das patas anteriores com os ratos com hemorragia bilateral, observamos que houve diferença no P15, por ser talvez mais intensa a lesão, sendo que no P11 não foi detectado, essa diferença, pela imaturidade dos mesmos, que acabaram todos não finalizando a tarefa.

Já quando testamos o cilindro, o teste de campo aberto e a avaliação cognitiva, para hemorragia unilateral, observamos que não houve diferença significativa, e isto talvez pela intensa plasticidade que o rato recém-nascido possui ⁴⁸, além do fato de que poderia a lesão não apresentar o tamanho suficiente para provocar alteração no teste. Também foi o que provavelmente ocorreu para a avaliação cognitiva da hemorragia bilateral para ratos com 30 dias de vida.

Na avaliação histológica do nosso estudo, observamos que a injeção de colagenase na região subependimária proporciona uma hemorragia difusa, com infarto muitas vezes do encéfalo e isto está em concordância também com os achados de Balasubramaniam ⁴. Em humanos, a atrofia da substância branca é frequentemente demonstrada após hemorragia periventricular ¹⁴. A hemorragia periventricular produz deficiência e redução do volume cortical em humanos ^{49, 50}, e estudos de imagens em humanos correlacionam a extensão da lesão com redução do volume, sendo diretamente proporcional ^{50, 51}. No presente estudo, observamos diminuição do volume no local da lesão tanto para os grupos com P7 e com P30. No entanto, alguns testes de comportamento neuromotor não foram significativos talvez porque eles não são suficientemente sensíveis para detectar ínfimas alterações.

Observou-se, também em concordância com a literatura, que com o uso da colagenase ocorre extravasamento de hemácias, sangramento intraventricular e periventricular, destruição do parênquima e conseqüentemente atrofia ^{4, 17}. Concluimos que o modelo estabelecido reproduz a injúria dos achados estruturais e repercussões funcionais observados em pré-termos humanos. É importante o estudo em modelos animais reproduzindo a hemorragia subependimária-intraventricular para que possamos levantar hipóteses e conhecer cada vez melhor sobre essa lesão e suas conseqüências, como a paralisia cerebral. Estes modelos seriam de grande valor em testar hipóteses no que concerne à fisiopatologia e ao dano cerebral, bem como para desenvolver novas medidas terapêuticas.

Referências Bibliográficas

1. Berger R, Bender S, Sefkow S, Klingmuller V, Kunzel W, Jensen A. Peri/intraventricular haemorrhage: a cranial ultrasound study on 5286 neonates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*1997 Dec;75(2):191-203.
 2. Kopelman B, Goukart A. Diagnóstico e tratamento em neonatologia. Atheneu, editor. São Paulo2004.
 3. Larroque B, Marret S, Ancel PY, Arnaud C, Marpeau L, Supernant K, et al. White matter damage and intraventricular hemorrhage in very preterm infants: the EIPAGE study. *J Pediatr*2003 Oct;143(4):477-83.
 4. Balasubramaniam J, Del Bigio MR. Animal models of germinal matrix hemorrhage. *J Child Neuro*2006 May;21(5):365-71.
 5. Ghazi-Birry M. Human germinal matrix: venous origin of hemorrhage and vascular characteristics. *Am J Neuroradiol*1997;18:219-24.
 6. Shalak L, Perlman JM. Hemorrhagic-ischemic cerebral injury in the preterm infant: current concepts. *Clin Perinatol*2002 Dec;29(4):745-63.
 7. Huang FP, Xi G, Keep RF, Hua Y, Nemoianu A, Hoff JT. Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products. *J Neurosurg*2002 Feb;96(2):287-93.
 8. Xue MDB, MR. Comparison of brain cell death and inflammatory reaction in three models of intracerebral hemorrhage in adult rats. *J Stroke Cerebrovas Dis*2003;12(3):152-9.
 9. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr*1978 Apr;92(4):529-34.
 10. Baumert M, Brozek G, Paprotny M, Walencka Z, Sadowska H, Cnota W, et al. Epidemiology of peri/intraventricular haemorrhage in newborns at term. *J Physiol Pharmacol*2008 Sep;59 Suppl 4:67-75.
-

-
11. Saigal S, Hoult LA, Streiner DL, Stoskopf BL, Rosenbaum PL. School difficulties at adolescence in a regional cohort of children who were extremely low birth weight. *Pediatrics* 2000 Feb;105(2):325-31.
 12. Stathis SL, O'Callaghan M, Harvey J, Rogers Y. Head circumference in ELBW babies is associated with learning difficulties and cognition but not ADHD in the school-aged child. *Dev Med Child Neurol* 1999 Jun;41(6):375-80.
 13. Stathis SL, O'Callaghan MJ, Williams GM, Najman JM, Andersen MJ, Bor W. Behavioural and cognitive associations of short stature at 5 years. *J Paediatr Child Health* 1999 Dec;35(6):562-7.
 14. Xue M, Balasubramaniam J, Buist RJ, Peeling J, Del Bigio MR. Periventricular/intraventricular hemorrhage in neonatal mouse cerebrum. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003 Nov;62(11):1154-65.
 15. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 1979 Mar;3(1):79-83.
 16. Clark WG, Vivonia CA, Baxter CF. Accurate freehand injection into the lateral brain ventricle of the conscious mouse. *J Appl Physiol* 1968 Sep;25(3):319-21.
 17. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 1990 May;21(5):801-7.
 18. Balasubramaniam J, Xue M, Buist RJ, Ivanko TL, Natuik S, Del Bigio MR. Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. *Exp Neurol* 2006 Jan; 197(1):122-32.
 19. Nan Z, Grande A, Sanberg CD, Sanberg PR, Low WC. Infusion of human umbilical cord blood ameliorates neurologic deficits in rats with hemorrhagic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 2005 May;1049:84-96.
 20. Rhoden. *Princípios e Técnicas em experimentação Animal*. Rio Grande do Sul 2006.
 21. Chesney JA, Kondoh T, Conrad JA, Low WC. Collagenase-induced intrastriatal hemorrhage in rats results in long-term locomotor deficits. *Stroke* 1995 Feb;26(2):312-6; discussion 7.
-

-
22. Rotstein M, Bassan H, Kariv N, Speiser Z, Harel S, Gozes I. NAP enhances neurodevelopment of newborn apolipoprotein E-deficient mice subjected to hypoxia. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Oct;319(1):332-9.
 23. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988 Nov 1;31(1):47-59.
 24. Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH, Izquierdo I. Stress hormones enhance retrieval of fear conditioning acquired either one day or many months before. *Behav Pharmacol* 2002 May;13(3):203-13.
 25. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2000 Mar 3;39(5):777-87.
 26. Vendrame M, Gemma C, de Mesquita D, Collier L, Bickford PC, Sanberg CD, et al. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev* 2005 Oct;14(5):595-604.
 27. Cherian SS, Love S, Silver IA, Porter HJ, Whitelaw AG, Thoresen M. Posthemorrhagic ventricular dilation in the neonate: development and characterization of a rat model. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003 Mar;62(3):292-303.
 28. Paxinos G WC. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 25 Borlongan CV, Hadman ed. Sydney: Academic Press; 1986.
 29. Avendano C, Roda JM, Carceller F, Diez-Tejedor E. Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. *Brain Res* 1995 Feb 27;673(1):83-92.
 30. Rodrigues AL, Arteni NS, Abel C, Zylbersztejn D, Chazan R, Viola G, et al. Tactile stimulation and maternal separation prevent hippocampal damage in rats submitted to neonatal hypoxia-ischemia. *Brain Res* 2004 Mar 26; 1002(1-2):94-9.
 31. Goddard J, Lewis RM, Alcalá H, Zeller RS. Intraventricular hemorrhage--an animal model. *Biol Neonate* 1980; 37(1-2):39-52.
-

-
32. Goddard J, Lewis RM, Armstrong DL, Zeller RS. Moderate, rapidly induced hypertension as a cause of intraventricular hemorrhage in the newborn beagle model. *J Pediatr*1980 Jun; 96(6):1057-60.
 33. Goddard-Finegold J, Armstrong D, Zeller RS. Intraventricular hemorrhage, following volume expansion after hypovolemic hypotension in the newborn beagle. *J Pediatr*1982 May; 100(5):796-9.
 34. Goddard-Finegold J, Michael LH. Cerebral blood flow and experimental intraventricular hemorrhage. *Pediatr Res*1984 Jan; 18(1):7-11.
 35. Tang T, Liu XJ, Zhang ZQ, Zhou HJ, Luo JK, Huang JF, et al. Cerebral angiogenesis after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res*2007 Oct 17;1175:134-42.
 36. Jeong SW, Chu K, Jung KH, Kim SU, Kim M, Roh JK. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke*2003 Sep; 34(9):2258-63.
 37. MacLellan CL, Silasi G, Poon CC, Edmundson CL, Buist R, Peeling J, et al. Intracerebral hemorrhage models in rat: comparing collagenase to blood infusion. *J Cereb Blood Flow Metab*2008 Mar; 28(3):516-25.
 38. Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev*1991 Jul; 26(1):61-7.
 39. Lee PA, Blasey K, Goldstein IJ, Pierce GB. Basement membrane: carbohydrates and x-ray diffraction. *Exp Mol Pathol*1969 Jun; 10(3):323-30.
 40. Kefalides NA, Forsell-Knott L. Structural changes in the protein and carbohydrate components of glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Biochim Biophys Acta*1970 Mar 17; 203(1):62-6.
 41. Kefalides NA. Isolation of a collagen from basement membranes containing three identical - chains. *Biochem Biophys Res Commun*1971 Oct 1;45(1):226-34.
 42. Volpe JJ. *Neurology of the newborn*. 4ª edição ed. Saunders. W, editor. Philadelphia2000.
-

-
43. Mrzljak L, Uylings HB, Van Eden CG, Judas M. Neuronal development in human prefrontal cortex in prenatal and postnatal stages. *Prog Brain Res*1990; 85:185-222.
 44. Nonaka M, Yoshikawa M, Nishimura F, Yokota H, Kimura H, Hirabayashi H, et al. Intraventricular transplantation of embryonic stem cell-derived neural stem cells in intracerebral hemorrhage rats. *Neurol Res*2004 Apr; 26(3):265-72.
 45. Caley DW, Maxwell DS. Development of the blood vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*1970 Jan; 138(1):31-47.
 46. Tomimatsu T, Fukuda H, Endoh M, Mu J, Watanabe N, Kohzuki M, et al. Effects of neonatal hypoxic-ischemic brain injury on skilled motor tasks and brainstem function in adult rats. *Brain Res*2002 Feb 1; 926(1-2):108-17.
 47. Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J Neurosci Methods*2002 Apr 15; 115(2):169-79.
 48. Benecke R, Meyer BU, Freund HJ. Reorganisation of descending motor pathways in patients after hemispherectomy and severe hemispheric lesions demonstrated by magnetic brain stimulation. *Exp Brain Res*1991; 83(2):419-26.
 49. Pinto-Martin JA, Riolo S, Cnaan A, Holzman C, Susser MW, Paneth N. Cranial ultrasound prediction of disabling and nondisabling cerebral palsy at age two in a low birth weight population. *Pediatrics*1995 Feb; 95(2):249-54.
 50. Vasileiadis GT, Gelman N, Han VK, Williams LA, Mann R, Bureau Y, et al. Uncomplicated intraventricular hemorrhage is followed by reduced cortical volume at near-term age. *Pediatrics*2004 Sep; 114(3):e367-72.
 51. Inder TE, Huppi PS, Warfield S, Kikinis R, Zientara GP, Barnes PD, et al. Periventricular white matter injury in the premature infant is followed by reduced cerebral cortical gray matter volume at term. *Ann Neurol*1999 Nov; 46(5): 755-60.
-

Legendas

Figura 1. (A e B) Imagens digitalizadas de uma secção anatômica coronal mostrando a impregnação com azul de metileno na região ventricular do hemisfério cerebral utilizando a técnica de injeção pelo método de *freehand*.

Figura 2. (A) Imagem digitalizada de vista lateral do encéfalo, 24 h após lesão. Podemos observar significativo sangramento na região parieto-temporal. (B, C e D) Imagens digitalizadas de cortes anatômicos coronais do encéfalo, mostrando hemorragia bilateral periventricular causada por 2 U de colagenase tipo VII.

Figura 3. Media do escore de ambulação. A locomoção foi caracterizada em categorias: sem movimento=0, assimetria do movimento de um membro=1, rastejando lentamente=2 e caminhada rápida=3. Dados expressos em medias \pm SEM (*Kruskal-Wallis* $p < 0,05$). (A) Gráfico mostrando ambulação para a hemorragia subependimária-intraventricular unilateral e o escore teve uma significância de $p < 0,0001$. No P7 o grupo controle negativo (CN) *versus* colagenase o foi de $p < 0,001$. No P11 o grupo controle negativo e salina (SF) tiveram melhor escore que a colagenase (C) $p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente. No P15 não houve diferença significativa. Legenda: controle negativo *versus* colagenase:*** $< 0,001$; grupo salina *versus* colagenase: # $< 0,05$. (B) Gráfico mostrando ambulação para hemorragia bilateral; o escore teve uma significância $p < 0,0001$. No P7 observou-se que o grupo controle negativo e salina foi melhor que o grupo da colagenase com $p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente. No dia P11 encontramos que o controle negativo e salina tiveram também melhor desempenho com um $p < 0,001$. E quando avaliamos no P15 não encontramos diferença, o desempenho foi igual. Legendas: controle negativo *versus* colagenase: ** $< 0,01$; *** $< 0,001$; salina *versus* colagenase # $< 0,05$; ### $< 0,001$.

Figura 4. No reflexo de endireitamento os dados são expressos em medias \pm SEM e analisados pela ANOVA de duas vias seguido do post hoc teste *Bonferroni*. (A) No gráfico da avaliação do reflexo de endireitamento com hemorragia unilateral tivemos uma significância de $p < 0,001$. No P7 ao comparar o controle negativo *versus* colagenase observamos que o primeiro foi mais rápido em realizar a tarefa com $p < 0,01$, com o passar dos dias os três grupos no P11 e no P15 foram parecidos para realizar o teste. Legenda: controle negativo *versus*

colagenase: ** <0,01. (B) Na hemorragia bilateral tivemos uma significância de $p < 0,0001$. O grupo com colagenase demorou mais para realizar as mesmas tarefas nos tempos P7, P11 e P15 ($p < 0,05$; $p < 0,05$ e $P < 0,001$) quando comparado com o controle negativo. E quando comparamos salina *versus* colagenase no P11 o grupo colagenase teve pior desempenho $p < 0,05$. E ao comparar soro fisiológico com controle no P15 $p < 0,05$. Legenda: controle negativo *versus* colagenase: * < 0,05; ** < 0,01; *** < 0,001; salina *versus* colagenase: # < 0,05; salina *versus* controle negativo: § < 0,05

Figura 5. Geotaxia negativa reflete a preferência dos filhotes ficarem olhando para cima numa superfície inclinada. Os dados foram expressos em $\text{media} \pm \text{SEM}$ e foi analisado com ANOVA de 2 vias seguido do teste *Bonferroni*. (A) Na hemorragia subependimária-intraventricular unilateral não houve diferença entre os três grupos ($p = 0,9660$). (B) Na a hemorragia bilateral encontramos uma significância de $p < 0,001$. No P7 observamos que o grupo controle negativo e salina foi mais rápido em realizar a tarefa com uma significância de $p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente. Legenda: controle negativo *versus* colagenase: * < 0,05; *** < 0,001; soro fisiológico *versus* colagenase: # < 0,05.

Figura 6. A preensão das patas anteriores foi iniciada no P11 e consistia no filhote ficar o maior tempo se assegurando numa barra. (A) Na hemorragia unilateral não houve diferença significativa no P11 $p = 0,692$ e no P15 $p = 0,456$. (B) Na hemorragia bilateral não houve diferença no P11 $p = 0,339$ e no P15 teve diferença significativa $p = 0,045$. Após foi utilizado um teste post hoc para hemorragia bilateral no P15 (teste de *Games-Howell*) mostrando que não houve diferença entre os grupos ($p = 0,074$ em relação ao grupo salina e $p = 0,070$ em relação ao grupo controle negativo).

Figura 7. Gráfico mostrando o teste do cilindro para hemorragia subependimária-intraventricular unilateral, com media e erro padrão para colagenase: $9,43 \pm 6,09$; grupo salina: $7,24 \pm 4,86$ e para o controle negativo: $5,96 \pm 4,16$ com um $p = 0,302$.

Figura 8. Gráficos mostrando o teste cognitivo na hemorragia subependimária-intraventricular unilateral. (A) No grupo controle negativo houve significância estatística $p = 0,007$ (B) No grupo salina o animal explorou mais o objeto novo, mas não teve significância estatística $p = 0,11$. (C) O grupo colagenase durante o teste explorou os dois objetos igualmente, não sendo significativo $p = 0,95$.

Figura 9. Gráficos mostrando o teste cognitivo para hemorragia subependimária bilateral. (A) No grupo controle negativo houve significância estatística=0,007. O animal reconheceu o objeto como o novo. (B) No grupo salina não foi estatisticamente significativo com $p=0,48$ (C) No grupo com colagenase também não foi significativo $p=0,20$.

Figura 10. Prancha com cortes histológicos e figuras com coordenadas estereotáxicas de um rato controle negativo com 7 dias de vida.

Figura 11. Prancha com cortes histológicos e figuras com coordenadas estereotáxicas de um rato com injeção unilateral de soro fisiológico com 7 dias de vida.

Figura 12. Prancha com cortes histológicos e figuras com coordenadas estereotáxicas de um rato com injeção bilateral de soro fisiológico com 7 dias de vida. Na injeção bilateral foi encontrado um cisto na região das fimbrias do hipocampo, provavelmente gerado por infiltração do soro fisiológico

Figura 13. Prancha com cortes histológicos e figuras com coordenadas estereotáxicas de um rato com injeção unilateral de colagenase com 7 dias de vida.

Figura 14. Prancha com cortes histológicos e figuras com coordenadas estereotáxicas de um rato com injeção unilateral de colagenase com 7 dias de vida.

Figura 15. Prancha com cortes histológicos e figuras com coordenadas estereotáxicas de um rato com injeção bilateral de colagenase com 7 dias de vida.

Figura 16. (A) Gráfico que mostra o volume do encéfalo com hemorragia subependimária-intraventricular no P7 foi encontrado uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos $p=0,0169$. Na comparação entre os grupos, observamos uma redução de volume encefálico nos grupos que receberam colagenase unilateral (C-UNI), em relação ao grupo salina unilateral (SF-UNI) e colagenase bilateral (C-BI), em relação aos grupos controle negativo (CN) e aos grupos salina unilateral e bilateral (SF-BI) ($p<0,05$). Legenda: controle negativo *versus* colagenase bilateral $p^*<0,05$; grupo salino bilateral *versus* colagenase bilateral: $\#<0,05$. (B) Gráfico que mostra o volume do encéfalo com hemorragia

subependimária-intraventricular unilateral e bilateral no P30 com um $p=0,0049$, sendo que os animais que receberam colagenase unilateral e bilateral apresentaram um volume encefálico significativamente menor, quando comparados aos animais controle negativo, $p<0,05$ e $p<0,01$ respectivamente. Legenda: controle negativo *versus* colagenase unilateral * $0,05$ e o controle negativo *versus* colagenase bilateral ** $< 0,01$

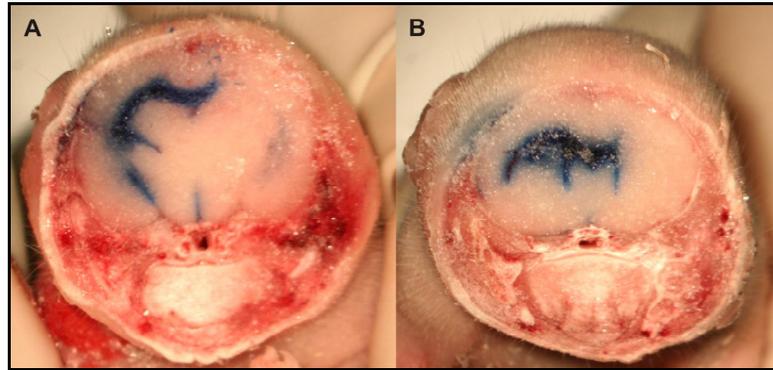
Figuras**Figura 1**

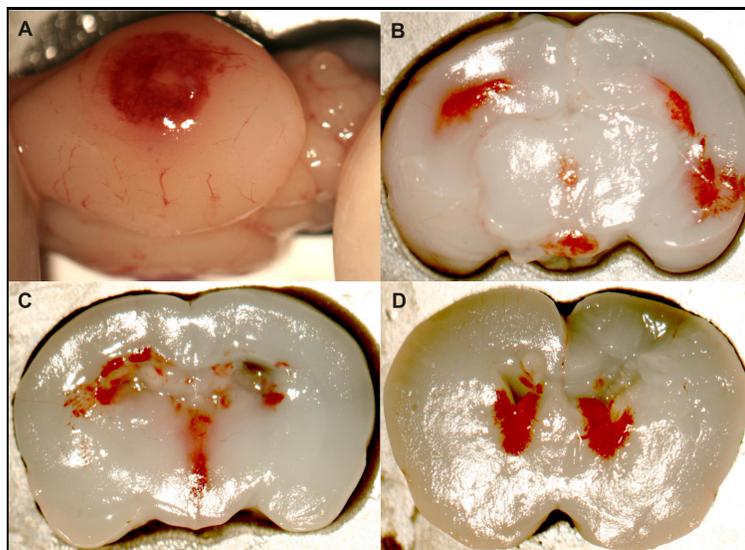
Figura 2

Figura 3

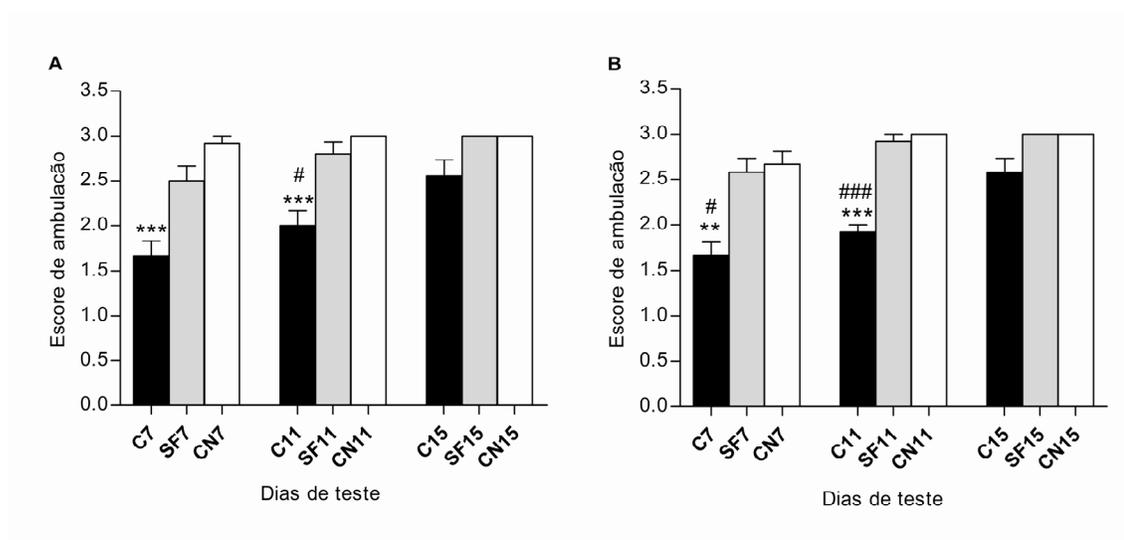


Figura 4

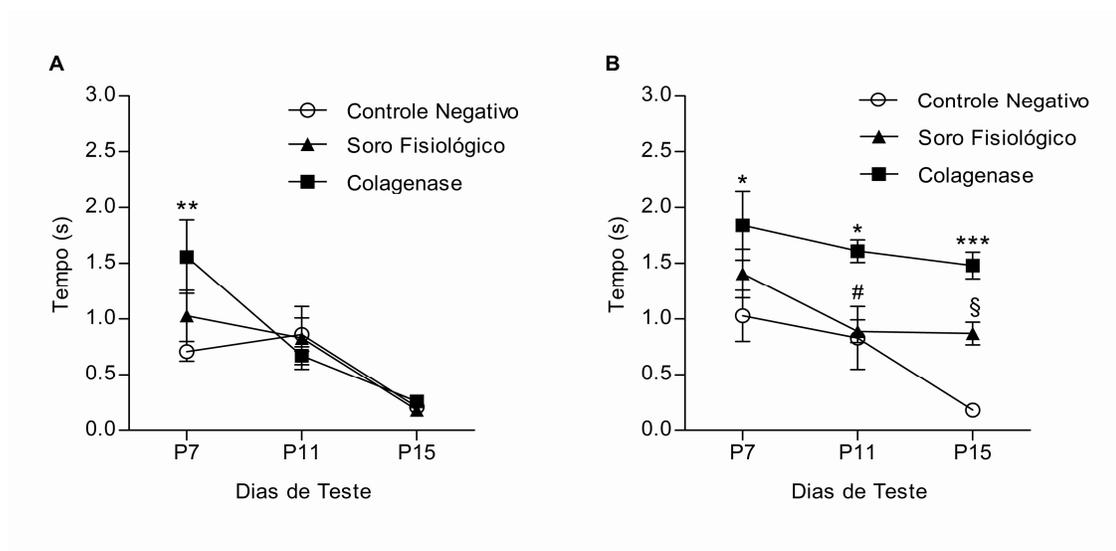


Figura 5

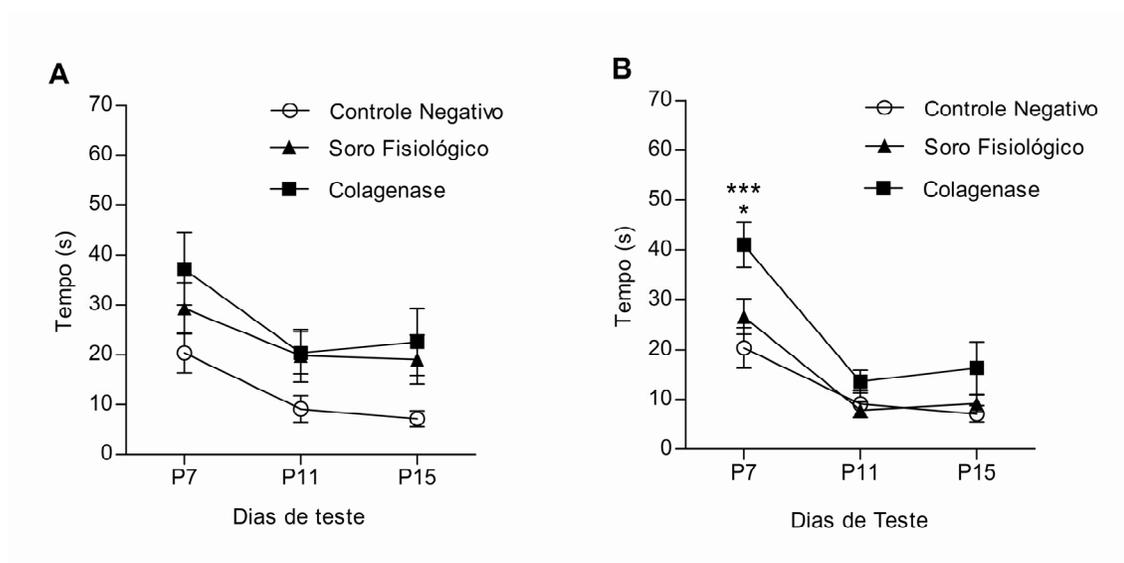


Figura 6

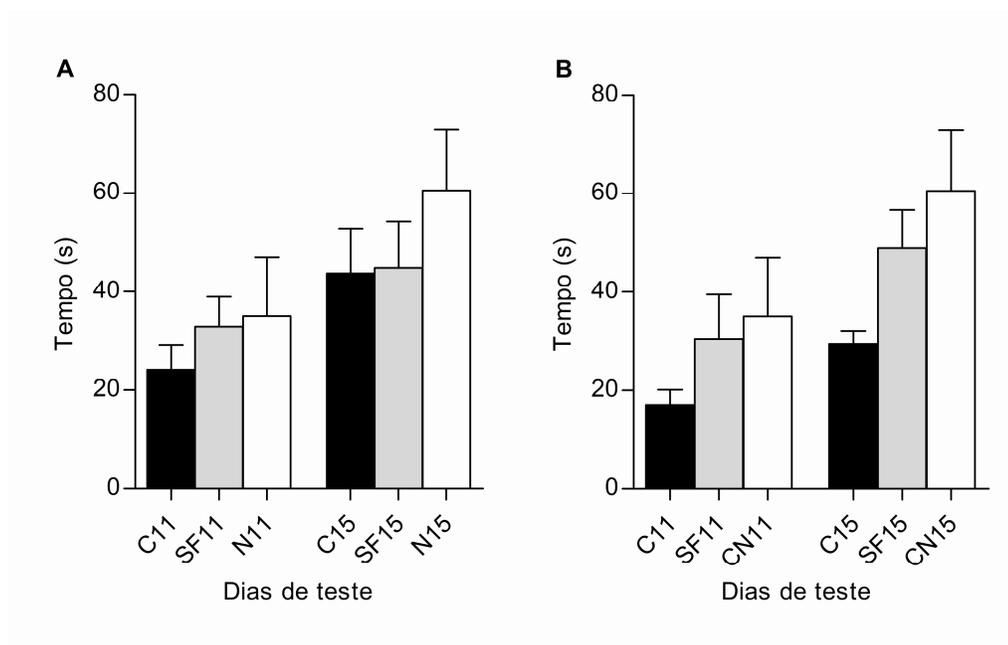


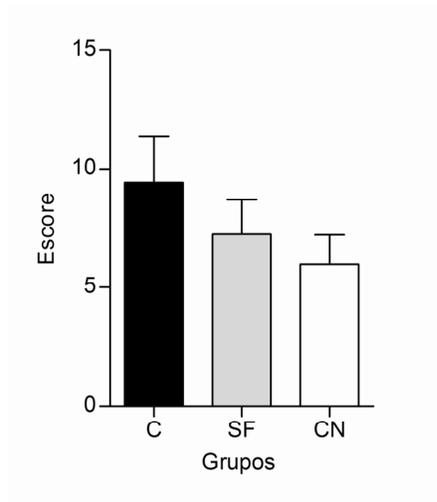
Figura 7

Figura 8

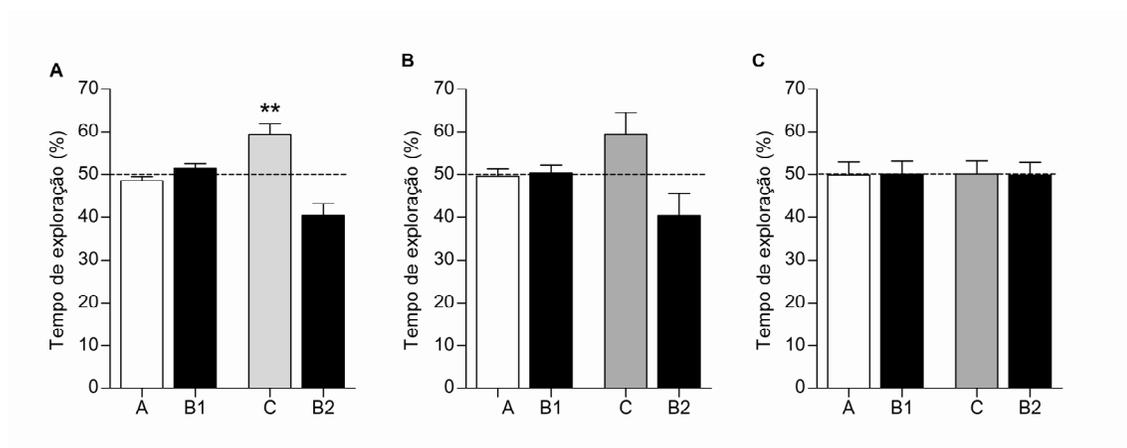


Figura 9

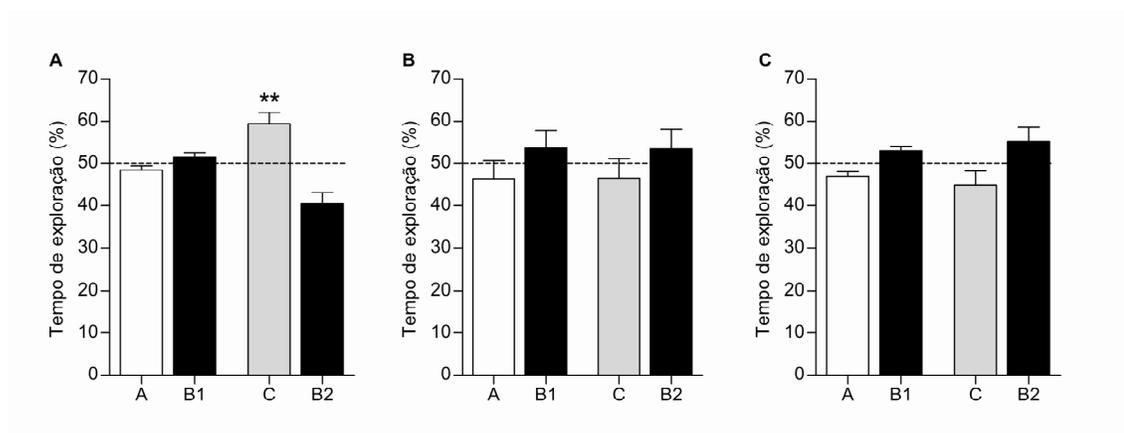


Figura 10

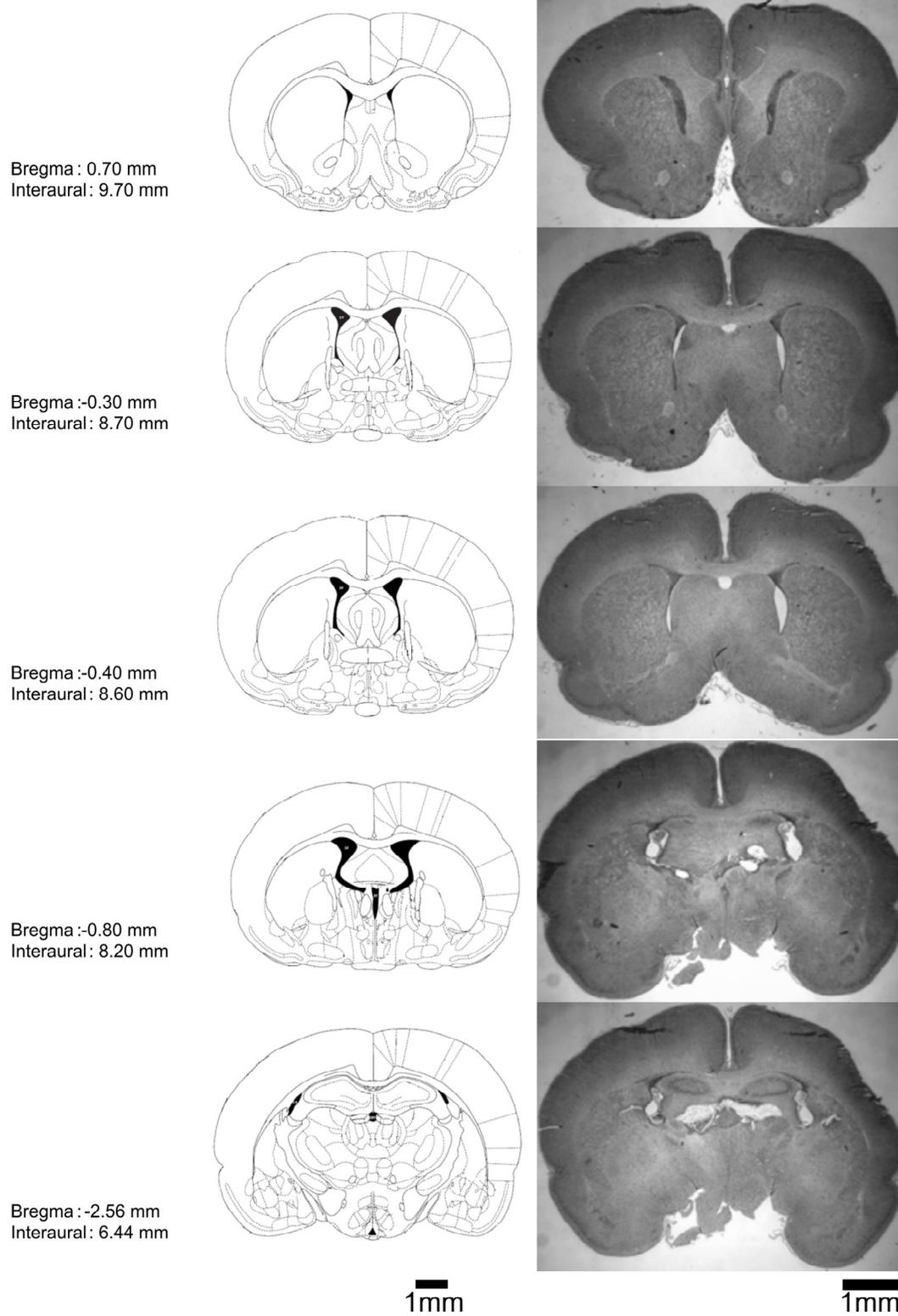


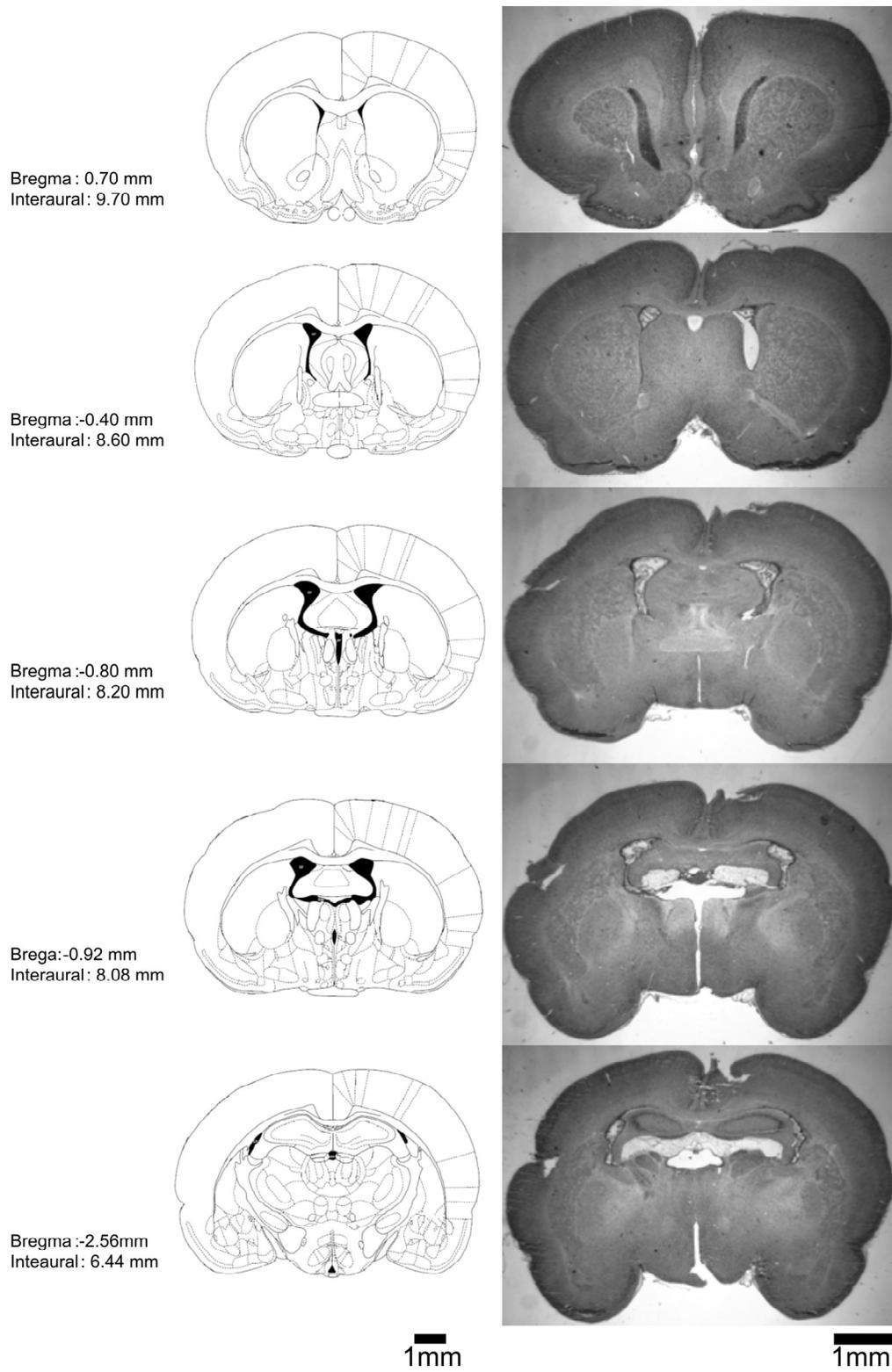
Figura 11

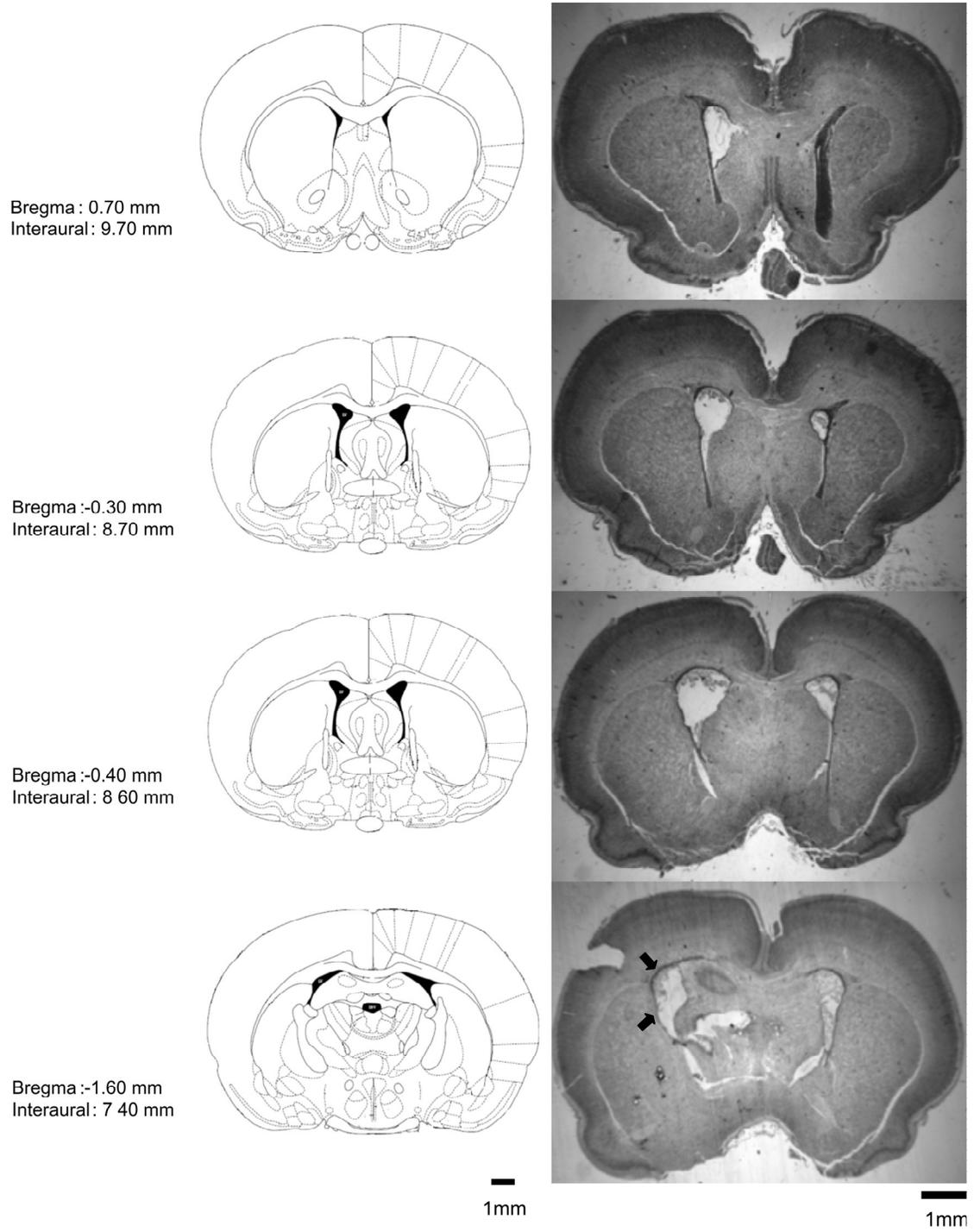
Figura 12

Figura 13

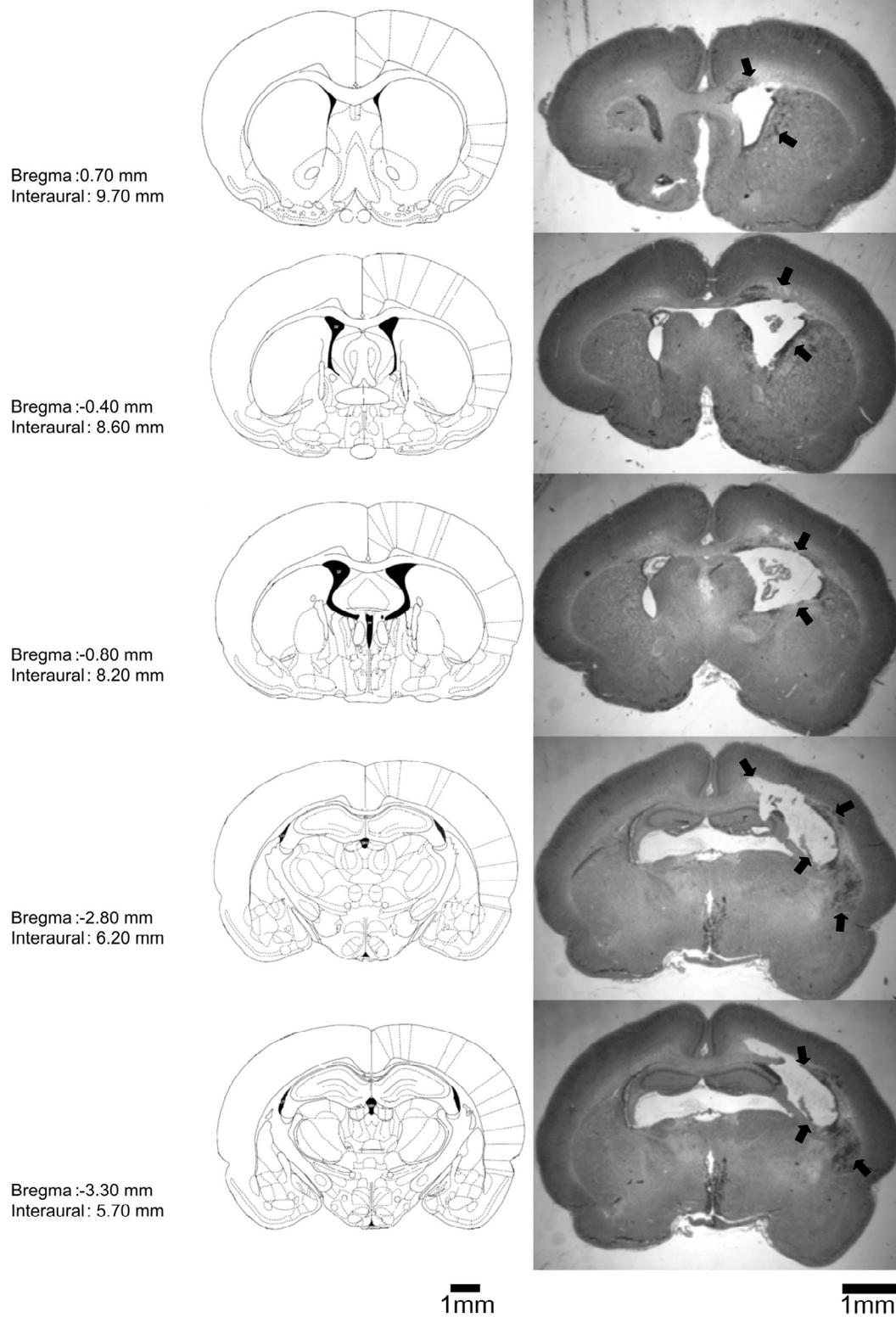


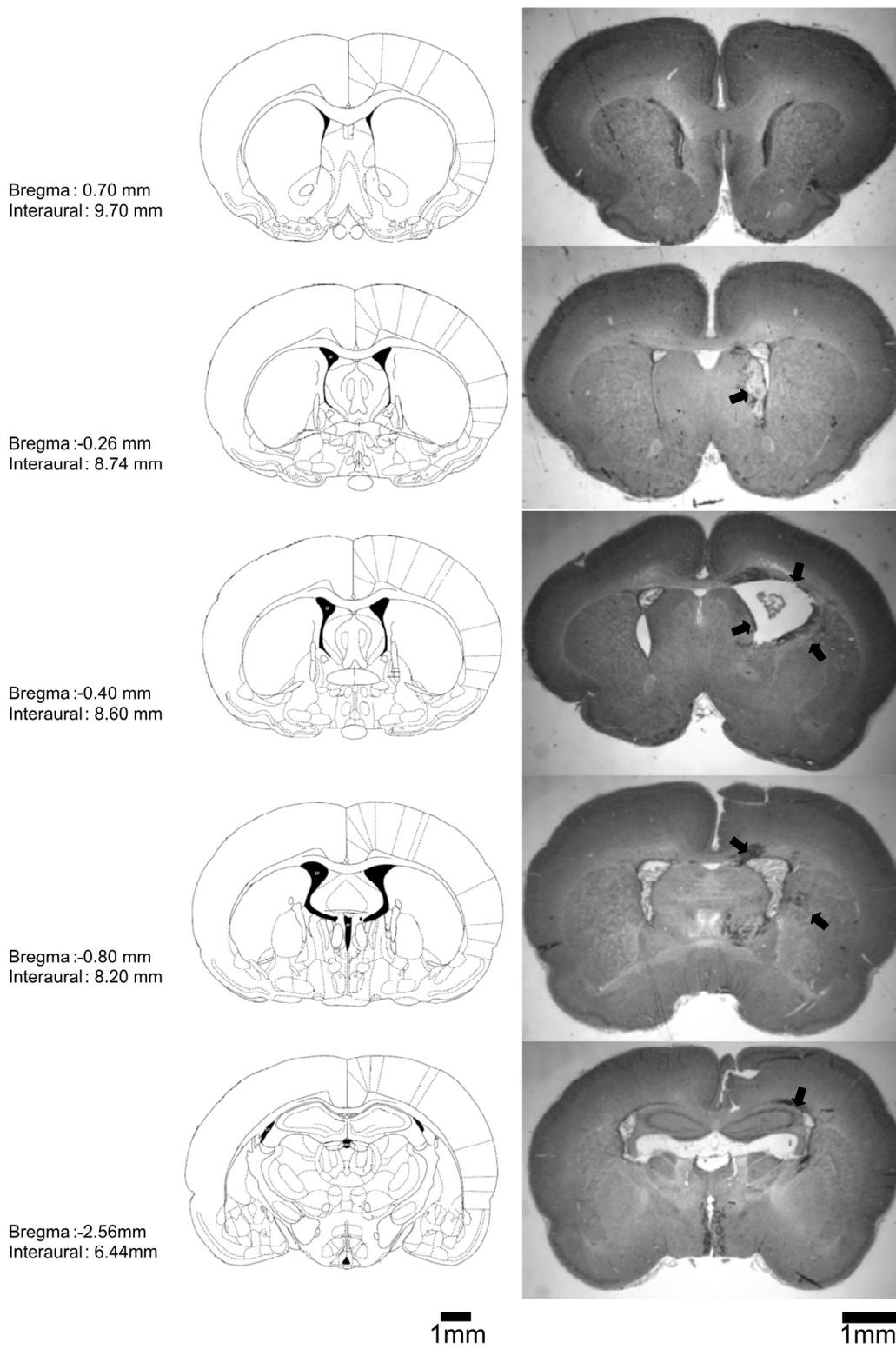
Figura 14

Figura 15

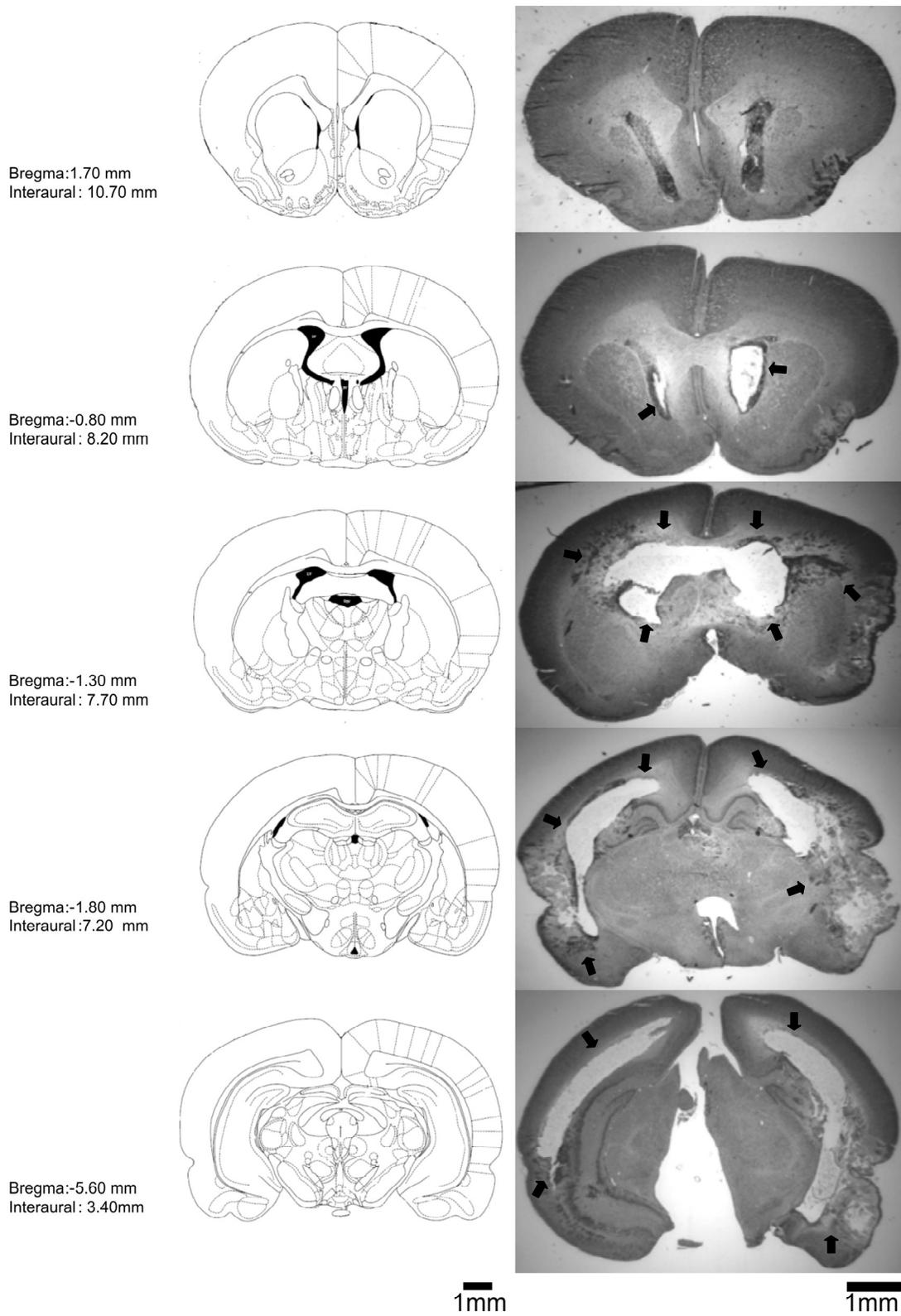
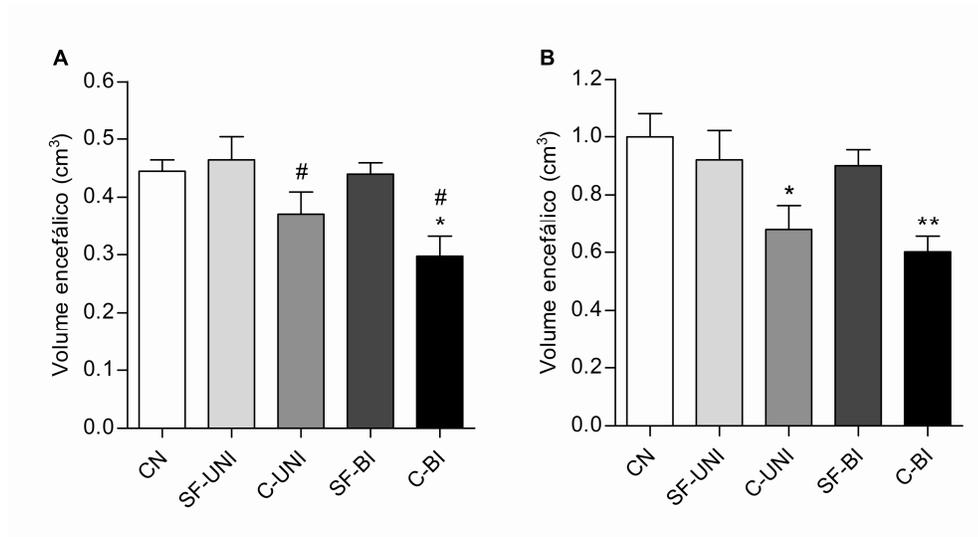


Figura 16



Tabelas**Tabela 1****Tabela 1 – Teste do campo aberto hemorragia unilateral**

Grupos/Testado	Controle	Salina	Colagenase	p valor
Endireitamento	40,33±10,63	30,25±14,50	28,83±14,02	0,098
Cruzamento	101,67±9,20	85,67±27,09	82,75±30,73	0,160

Tabela 2**Tabela 2 – Teste do campo aberto hemorragia bilateral**

Grupos/Testado	Controle	Salina	Colagenase	p valor
Endireitamento	40,33±10,63	29,6±11,77	26,89±5,02	0,012
Cruzamento	101,67±9,20	76,6±27,32	79,78±16,73	0,012

CAPÍTULO IV

7 CONCLUSÕES DETALHADAS

- 1) O modelo de hemorragia subependimária-intraventricular em ratos recém-nascidos (P6) foi estabelecido utilizando a colagenase tipo VII;
 - 2) O método de indução de hemorragia subependimária-intraventricular foi padronizado e simplificado para fácil execução;
 - 3) As alterações neuromotoras são evidentes nos primeiros dias pós-indução da hemorragia (fase aguda), havendo recuperação da maioria dessas funções após os 15 dias de vida. As alterações cognitivas foram estatisticamente da mesma magnitude nos animais com lesão hemorrágica uni- ou bilateral;
 - 4) A avaliação histológica evidenciou alterações estruturais semelhantes às observadas na patologia humana. Houve redução do volume do encéfalo no lado correspondente (P7 e P30) à área da hemorragia (unilateral) ou em ambos os hemisférios (hemorragia bilateral).
-