

POLIANA PENASSO

**REPERCUSSÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DO
DIMETILSULFÓXIDO EM GERBILS SUBMETIDOS À ISQUEMIA
CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Universidade de Franca, como exigência parcial para a obtenção do título de Mestre em Promoção de Saúde.

Orientador: Profº Dr. Márcio Botelho de Castro

**FRANCA
2005**

POLIANA PENASSO

**REPERCUSSÕES CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DO DIMETILSULFÓXIDO EM
GERBIS SUBMETIDOS À ISQUEMIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Presidente: _____

Nome:

Instituição:

Titular 1: _____

Nome:

Instituição:

Titular 2: _____

Nome:

Instituição:

Franca, ____ / ____ / ____

DEDICO este trabalho a todos aqueles ligados à Fisioterapia que tenham em mente a preocupação e a vontade de a cada dia refletir e melhorar sua condição profissional e humana no contexto de suas relações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me deu a coragem necessária para atingir os meus objetivos; à minha família que sempre me incentivou a melhorar minha condição profissional e humana;

ao Maxwell pelo amor, pelo respeito e pelo apoio em tudo na minha vida;

à minha grande amiga Ana Paula, excelente fisioterapeuta e grande responsável pela realização deste trabalho;

ao meu orientador Márcio, o qual sempre se mostrou disponível e participou ativamente da realização e finalização desta tese;

ao professor José Alexandre Bachur, por acreditar no meu trabalho.

Enfim, a todos que colaboraram para a realização deste trabalho, meu respeito, homenagem e gratidão.

Em todas as ocasiões, mantenha a mente aberta para a mudança. Receba-a de braços abertos. Corteje-a. Somente através do exame e reexame de suas opiniões e idéias você poderá evoluir.

Dale Carnegie

RESUMO

PENASSO, P. Repercussões clínicas e histopatológicas do dimetilsulfóxido em gerbils submetidos à isquemia cerebral experimental. 2005. 94 folhas. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, Franca-SP.

O objetivo do presente estudo foi investigar as ações neuroprotetoras do dimetilsulfóxido nas alterações clínico-comportamentais e histopatológicas do encéfalo de gerbils submetidos à isquemia cerebral experimental através da oclusão permanente da artéria carótida comum esquerda. Os animais foram divididos em 5 grupos com 6 animais cada. Os animais controles foram os não operados (grupo I), falsos operados (grupo II – sham) e isquemeados não tratados (grupo III). Os animais que receberam DMSO foram dos grupos IV e V. Trinta minutos antes da cirurgia experimental, 215mg/kg de DMSO a 10% foi administrado intraperitonealmente nos animais do grupo IV (DMSO I) e 645mg/kg de DMSO a 10% nos animais do grupo V (DMSO II). Sinais clínicos de lesão neurológica foram observados no 1º dia pós-isquemia. O comportamento motor exploratório foi avaliado através da freqüência de cruzamentos e levantamentos observados na arena circular durante os quatro dias subsequentes à isquemia. Eutanásia foi realizada no 7º dia pós-isquemia para posterior análise histológica do encéfalo. Para análise estatística utilizou-se o teste ANOVA (significância estatística $p<0,05$). A taxa de mortalidade após a isquemia foi de 60% no grupo isquemado não tratado, 33,4% no grupo DMSO I e 14,3% no grupo DMSO II. Os animais não tratados apresentaram sinais clínicos de lesão, como flexão da pata dianteira (hemiparesia), marcha espontânea em círculo e ptose palpebral. Os animais tratados (DMSO I e II) apresentaram apenas ptose palpebral. Os animais tratados (DMSO I e II) apresentaram maior freqüência de cruzamentos no 2º, 3º e 4º dias em relação ao grupo isquemado não tratado. O grupo DMSO I apresentou maior freqüência de levantamentos no 2º e 4º dias e o grupo DMSO II em todos os dias de avaliação em relação ao grupo isquemado não tratado. Os resultados histopatológicos evidenciaram extensas áreas de necrose de células nervosas no hipocampo e córtex frontal, parietal e temporal no grupo isquemado não tratado. Nos animais tratados as áreas isquêmicas foram reduzidas. O grupo DMSO II apresentou menor porcentagem de neurônios isquêmicos hipocampais ($46,1\pm3,4$) em relação ao grupo DMSO I ($54,6\pm11,7$) e grupo isquemado não tratado ($71,17\pm10$). DMSO reduziu mortalidade pós-isquemia, permitiu melhor comportamento motor exploratório e reduziu lesões isquêmicas encefálicas, sugerindo efeito neuroprotetor para estes animais.

Palavras-chave: dimetilsulfóxido, isquemia cerebral, gerbil.

ABSTRACT

PENASSO, P. Repercussões clínicas e histopatológicas do dimetilsulfóxido em gerbils submetidos à isquemia cerebral experimental. 2005. 94 folhas. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, Franca-SP.

The objective of this work was verify neuroprotective effects of dimethyl sulfoxide in neurological and histopathological findings in gerbils subjected to experimental brain ischemia produced by ligation of the left common carotid artery. The animals were divided into five groups with six animals each. The control animals were no-operated (group I), sham-operated (group II) and ischemic animals (group III – ischemic no trated). The animals who received DMSO were group IV and V. Half hour before surgery, 215mg/kg of 10% DMSO was administered intraperitoneally to group IV animals (DMSO I) and 645mg/kg of 10% DMSO to group V animals (DMSO II). Neurologic clinical symptoms were verify one day after ischemia. The motor behaviour were verified though the crossing and raising behaviours observed in an acrylic circular arena during four days after ischemia. On the 7th day, the animals were sacrificed and your brains removed for histopathological analyses. ANOVA (statistical significance p<0,05) was utilized for statistical analysis. The total post-infarction mortality rate was 60% for ischemic animals no trated, 33,4% for group DMSO I animals and 14,3% for group DMSO II animals. The ischemic animals (group III) showed clinical symptoms, how ipsilateral hemiparesis, circling behavior and ptosis of the eyelids. The trated animals (DMSO I and II groups) showed only ptosis of the eyelids. The DMSO I and II groups showed statistically significative bigger frequency in the crossings for the 2^{sd}, 3th and 4th days related to ischemic animals (group III). The DMSO I group showed bigger frequency in the rearing for the 2^{sd} and 4th days and DMSO II group for the all days related to ischemic animals (group III). The histopathological data showed evidence of extensive areas of brain cell necrosis in hippocampus and forebrain (frontal, parietal and temporal cortex) in ischemic animals (group III). In the trated animals, the ischemic areas were reduced. The DMSO II group showed reduction of hippocampal ischemic cells percentage ($46,1\pm3,4$) related to DMSO I ($54,6\pm11,7$) and ischemic no trated animals ($71,17\pm10$). DMSO reduced post-infarction mortality, permitted better motor behaviour than no trated animal and reduced isquemic damage, sugesting neuroprotective effect for this animals.

Key words: dimethyl sulfoxide, brain ischemia, gerbil.

LISTA DE ABREVIACÕES

ACC – artéria carótida comum

AVC - acidente vascular cerebral

AVCs – acidentes vasculares cerebrais

Ca++ - íons cálcio

DMSO – dimetilsulfóxido

DPM – desvio padrão da média

EPM – erro padrão da média

H-E - hematoxilina e eosina

IP₃ - trifosfato de inositol

K+ - potássio

NMDA - N-metil-D-aspartato

OBJ - objetiva

SNC – sistema nervoso central

UNIFRAN - Universidade de Franca

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema demonstrativo da cirurgia experimental.....	46
Figura 2 – Análise do comportamento exploratório na arena circular.....	48
Figura 3 - Esquema de corte coronal do encéfalo e medula espinhal cervical de roedores.....	49
Figura 4 - Esquema dos cortes transversais de encéfalo de roedores	50
Figura 5 – Mortalidade após isquemia encefálica experimental	53
Figura 6 – Manifestação clínica (ptose palpebral) apresentada pelos animais submetidos à isquemia experimental	54
Figura 7 – Avaliação clínica após isquemia encefálica experimental	54
Figura 8 - Freqüências de cruzamentos apresentadas pelos animais dos grupos controle, falso operado (sham), grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II.....	56
Figura 9 - Freqüências de levantamentos apresentadas pelos animais dos grupos controle, falso operado (sham), grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II.....	58
Figura 10 – Foco necrótico no hipocampo do grupo isquemia não tratado (HE – Objetiva (Obj) 10x).....	60
Figura 11 – Cortes histológicos do hipocampo. A) Grupo controle sem alterações morfológicas neuronais. B) Grupo isquemia não tratado com presença de células com alterações isquêmicas (HE – Obj. 40x).....	60

Figura 12 – Cortes histológicos do hipocampo. A) Grupo DMSO I com alterações morfológicas neuronais isquêmicas moderadas. B) Grupo DMSO II com alterações isquêmicas leves dos neurônios (HE – Obj. 40x).....	61
Figura 13 - Porcentagem de células isquêmicas no hipocampo apresentada pelos animais dos grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II.....	62

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL.....	15
1.1.1 Epidemiologia.....	16
1.1.2 AVC Isquêmico.....	17
1.1.3 AVC Hemorrágico.....	18
1.1.4 Achados clínicos.....	19
1.1.5 Eventos celulares que ocorrem após lesão neuronal.....	20
1.1.5.1 Isquemia cerebral global (encefalopatia hipóxico-isquêmica)	21
1.1.5.2 Isquemia cerebral focal (infarto cerebral)	23
1.1.6 Efeitos metabólicos da lesão encefálica.....	25
1.2 ISQUEMIA ENCEFÁLICA EXPERIMENTAL.....	27
1.2.1 Modelos de isquemia encefálica global experimental em ratos.....	28
1.2.2 Modelos de isquemia encefálica em gerbils.....	29
1.2.3 Avaliação dos resultados da isquemia cerebral experimental.....	32
1.2.3.1 Avaliação clínica.....	32
1.2.3.2 Avaliação do comportamento motor.....	33
1.2.3.3 Análise histopatológica.....	34
1.3 DIMETILSULFÓXIDO (DMSO).....	35

1.3.1 Propriedades fisico-químicas do DMSO.....	35
1.3.2 Aplicações farmacológicas do DMSO.....	36
1.3.3 Toxicologia do DMSO.....	37
1.3.4 DMSO e neuroproteção.....	40
2. OBJETIVO.....	42
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.1 ANIMAIS.....	43
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	44
3.3 APLICAÇÃO DO DMSO.....	45
3.4 CIRURGIA EXPERIMENTAL.....	45
3.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR PÓS-ISQUEMIA.....	47
3.6 HISTOPATOLOGIA.....	48
3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	50
4. RESULTADOS.....	52
4.1 ÍNDICE DE MORTALIDADE.....	52
4.2 COMPORTAMENTO MOTOR PÓS-ISQUEMIA.....	53
4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA.....	59
5. DISCUSSÃO.....	63
CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICE.....	90
ANEXO.....	94

INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) define-se como um déficit neurológico súbito causado por isquemia ou hemorragia no sistema nervoso central (SNC). O AVC isquêmico contribui para cerca de 75% de todos os casos em humanos, sendo causado por uma oclusão vascular localizada, levando à interrupção do fornecimento de oxigênio e glicose ao tecido cerebral, afetando subsequentemente os processos metabólicos do território envolvido (EKMAN, 2000).

No Brasil é considerada a terceira maior causa de morte na população, após doenças cardiovasculares e o câncer, além de ser uma das maiores causas de seqüelas permanentes que geram incapacidade e afastamento do trabalho (LESSA, 1999; LOTUFO, 2000).

Os pacientes apresentam hemiparesia, ataxia, deficiências visuo-perceptivas, afasia, disartria, deficiências sensoriais e problemas com o controle vesical (EKMAN, 2000). Segundo Stokes (2000), dos pacientes que apresentaram AVC, 30% apresentam recuperação total, 40% incapacidade residual e 30% morrem nas primeiras três semanas.

Para o estudo sistemático da fisiopatologia e tratamento da isquemia cerebral, é essencial que modelos em animais sejam reproduzidos. Há várias razões para isso: acidentes vasculares cerebrais (AVCs) em humanos apresentam diversas manifestações, causas e áreas anatômicas, o que impede a análise precisa da lesão; investigações histopatológica, bioquímica e

fisiológica freqüentemente requerem cirurgia invasiva, com procedimentos e acesso direto ao tecido cerebral, e eventos que ocorrem durante os primeiros segundos a minutos de um insulto isquêmico só podem ser estudados em animais de laboratório (GINSBERG; BUSTO, 1989). Os resultados da isquemia experimental podem ser avaliados por vários métodos como: o comportamento motor do animal (BABCOCK, 1993), o estudo anatômopatológico (BERRY, 1975; YANIGIHARA, 1978) e as análises bioquímicas e histoquímicas (KAHN, 1972). Pode-se, ainda, testar novas drogas para a terapêutica do AVC (de la TORRE, 1991; BAILEY, 1995).

Dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto que tem estimulado muitas controvérsias na literatura científica e popular, cujas propriedades farmacológicas e fisiológicas não são completamente entendidas. Neste sentido, propriedades consideradas importantes para seus efeitos terapêuticos e tóxicos incluem sua rápida penetração e aumento da penetração de outras substâncias através de membranas biológicas, varredor de radicais livres, efeitos sobre a coagulação (antagonismo da agregação plaquetária), atividade anticolinesterásica, efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e anestésico local. Não há consenso entre os trabalhos realizados anteriormente sobre a eficácia do DMSO como neuroprotetor em isquemia cerebral experimental (LITTLE et al., 1983; McGRAW, 1983; WEINSTEIN et al., 1986; de la TORRE, 1991; SUGITA et al., 1993; SHIMIZU et al., 1997; PHILLIS et al., 1998; GREINER et al., 2000).

O presente estudo, realizado no laboratório de pesquisa do Hospital Veterinário da Universidade de Franca, teve como objetivo investigar os efeitos clínicos e histopatológicos do dimetilsulfóxido em gerbils submetidos à isquemia cerebral experimental.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL

A definição de AVC, pela Organização Mundial de Saúde, é um sinal clínico de rápido desenvolvimento de perturbação focal da função cerebral, de suposta origem vascular e com mais de 24 horas de duração (STOKES, 2000). Do ponto de vista da fisiopatologia e anatomia patológica, considera-se as doenças vasculares cerebrais como dois processos: 1) hipóxia, isquemia e infarto resultantes de comprometimento do suprimento sanguíneo e da oxigenação do tecido do SNC – AVC isquêmico; 2) hemorragia devido à ruptura de vasos do SNC – AVC hemorrágico (GIROLAMI et al., 2000).

Tratamento medicamentoso para lesão hipóxica-isquêmica cerebral é controverso e nenhum tratamento é estabelecido. Classes de drogas têm sido estudadas para o tratamento da isquemia cerebral, como: bloqueadores de cálcio; anticonvulsivantes e drogas que deprimem o metabolismo cerebral; drogas que promovem microcirculação pós-isquemia; prostaglandinas e drogas que afetam a síntese de prostaglandina; e varredores de radicais livres (GISVOLD; STEEN, 1985).

As pesquisas de novos recursos terapêuticos visam reduzir os déficits motores-funcionais dos pacientes que sofreram AVC. A fisioterapia visa restabelecer as atividades de vida

diária do indivíduo, objetivo mais facilmente alcançado quanto menor a lesão do SNC pós-isquemia.

1.1.1 Epidemiologia

O AVC é uma das causas mais comuns de disfunção neurológica que ocorre na população adulta. De acordo com Stokes (2000) esta enfermidade é responsável por aproximadamente 25% dos óbitos nos países desenvolvidos e por grande parte das incapacidades físicas que atingem os idosos. Segundo Lockette e Keyes (1994), nos Estados Unidos cerca de três milhões de pessoas sobrevivem a um AVC e aproximadamente 500.000 apresentam um novo AVC ou uma recidiva por ano. No Brasil é considerada a terceira maior causa de morte, após doenças cardiovasculares e o câncer, além de ser uma das maiores causas de seqüelas permanentes que geram incapacidade e afastamento do trabalho (LESSA, 1999; LOTUFO, 2000). A alta incidência e o alto custo fazem da redução do AVC uma prioridade nacional e salienta a necessidade de métodos mais exatos para identificar nos pacientes os prognósticos e as formas terapêuticas adequadas para a reabilitação (DOBKIN, 1995).

Os fatores de risco para o AVC são, entre outros, o fumo, a inatividade física, a obesidade, o estresse, as taxas séricas elevadas de colesterol, a intolerância a glicose (diabetes), o uso de contraceptivos orais, a predisposição genética e principalmente a hipertensão arterial e doenças cardíacas preexistentes (CHAVES, 2000). Em um estudo realizado por Umphred (2004), dos pacientes portadores de isquemia cerebral, 70% apresentavam hipertensão arterial, 30% doença cardíaca coronariana, 15% doença cardíaca congestiva, 30% doença arterial periférica e

15% diabetes. Estudos epidemiológicos indicam que a hipertensão arterial é o fator de risco modificável mais importante para se reduzir a incidência de AVC (FUCHS et al., 2000; LOTUFO, 2000).

1.1.2 AVC Isquêmico

Embora os processos bioquímicos do sofrimento isquêmico cerebral sejam uniformes, há uma série de diferentes causas de AVC isquêmico, incluindo: lesões estenóticas ateroscleróticas e aterotrombóticas das artérias cervicais extracranianas e das grandes artérias cerebrais da base do crânio, causando uma hipoperfusão crítica distal às estenoses graves; embolismo de ponto de partida arterial de lesões aterotrombóticas causando oclusão de vasos intracranianos; embolismo sistêmico (fontes cardíacas como próteses valvulares, fibrilação auricular, trombos cardíacos, cardiomiopatia dilatada, infarto do miocárdio recente ou shunts intracardíacos). Causas menos comuns incluem dissecção arterial cervical, vasculite ou trombose secundária a coagulopatias trombofilicas (GIROLAMI et al., 2000). Os ataques isquêmicos transitórios são causados por uma obstrução temporária de uma artéria encefálica (UMPHERED, 2004).

A causa mais comum de AVC isquêmico é obstrução de uma das artérias principais como a média, posterior e anterior, em ordem descendente de freqüência, ou de seus ramos perfurantes menores que vão para as partes mais profundas do cérebro. Os AVCS do tronco encefálico, ocasionados por alterações nas artérias vertebrais e basilar, são menos comuns. Aproximadamente 80% dos AVCS devem-se à oclusão, seja em decorrência de ateroma na artéria

propriamente dita ou por êmbolos secundários, que são transportados do coração ou dos vasos do pescoço que apresentam placas de ateroma (STOKES, 2000).

1.1.3 AVC Hemorrágico

O AVC hemorrágico, resultado do extravasamento de sangue para dentro ou para o entorno das estruturas do SNC, resulta em lesão em áreas intraparenquimatosa ou subaracnóidea (CHAVES, 2000). É causado por ruptura das pequenas artérias penetrantes no interior do cérebro, aneurismas congênitos ou malformações arteriovenosas congênitas. A hipertensão arterial pode levar ao AVC hemorrágico por deixar as paredes arteriais enfraquecidas ocasionando a formação de pequenas herniações e microaneurismas que podem romper-se. A lipo-hialinose dos pequenos vasos cerebrais leva a lesões lacunares microangiopáticas. Outras causas seriam a angiopatia amilóide e diásteses hemorrágicas (STOKES, 2000).

Dos AVCs hemorrágicos, 9% são causados por hemorragia nas partes profundas do cérebro. O hematoma resultante pode espalhar-se pelos planos sulcados da substância branca, formando uma lesão de massa substancial. Os hematomas, via de regra, ocorrem nas regiões mais profundas do cérebro, comprometendo o tálamo, o núcleo lentiforme e a cápsula externa e, com menos freqüência, o cerebelo e a ponte. Podem romper-se no sistema ventricular, que leva ao óbito rapidamente. A hemorragia subaracnóidea em geral é decorrente da ruptura de um aneurisma saculado situado no círculo de Willis ou próximo dele. O local mais comum é a região da artéria comunicante anterior, sendo que as lesões nas artérias posterior e média do cérebro têm quase a mesma freqüência (STOKES, 2000).

1.1.4 Achados clínicos

Os déficits neurológicos focais que resultam de um AVC, seja embólico, trombótico ou hemorrágico, é um reflexo do tamanho e localização da lesão e da quantidade de fluxo sanguíneo colateral. Os déficits neurológicos agudos apresentados por esses pacientes incluem a hemiparesia, ataxia, deficiências visuo-perceptivas, afasia, disartria, deficiências sensoriais e amnésias e problemas com o controle vesical. Dentre os distúrbios do movimento encontrados, a hemiplegia ou hemiparesia é um dos sinais clínicos mais óbvios da doença. Embora o local e o tamanho da lesão vascular cerebral inicialmente determine o grau de função motora, a presença concomitante de comprometimento sensório soma-se ao problema de disfunção motora (EKMAN, 2000).

Após o início de um AVC, ocorre um estado de hipotonia muscular. A duração desse estado varia desde um pequeno intervalo até um período de semanas ou meses. É acompanhado pelo desenvolvimento de padrões de retorno a função muscular e padrões de hipertonia. A velocidade com a qual esses padrões de função muscular retornam é ditada pelo local e gravidade da lesão, e, ainda, pelo enfoque do processo de reabilitação (UMPHRED, 2004).

Neurofisiologicamente, esse distúrbio cerebrovascular lesa as vias neuronais descendentes, causando a lesão do motoneurônio superior. Se o AVC ocorre no seu local comum para esse tipo de lesão, a artéria cerebral média, as conexões corticais com a medula espinhal, o tronco encefálico e o cerebelo são comprometidos. Assim, essa lesão pode alterar os efeitos de todas as áreas motoras supramedulares, dependendo da extensão da lesão. Contudo, com exceção das influências corticais diretas, as demais áreas motoras supramedulares continuam a exercer

algum controle sobre a atividade dos motoneurônios inferiores. O controle anormal resultante da atividade motora provoca a hiperatividade dos músculos antigravitários durante a posição ereta. Os músculos antigravitationais incluem os extensores dos membros inferiores e os flexores dos membros superiores. Ocorre ativação muscular anormal porque as aferências córtico-espinhais são perdidas e o trato retículo-espinhal lateral fica privado de sua facilitação cortical normal, deixando o trato retículo-espinhal medial e os tratos vestíbulo-espinhais relativamente livres de oposição para facilitar os extensores. Os tratos retículo-espinhal medial e vestíbulo-espinhal permanecem ativos porque sua atividade é menos dependente da facilitação cortical. A atividade do trato rubro-espinhal intacto pode contribuir para a flexão do membro superior (EKMAN, 2000).

Dessa forma, diversos fatores interferem no funcionamento motor da hemiplegia ou hemiparesia como o distúrbio no mecanismo de reflexo postural normal, seqüenciamento anormal da ativação muscular e a presença de espasticidade (STOKES, 2000).

1.1.5 Eventos celulares que ocorrem após lesão neuronal

O cérebro requer um suprimento constante de glicose e oxigênio, os quais são transportados pela circulação e respondem por 15% do débito cardíaco em repouso e 20% do consumo corporal total de oxigênio. O fluxo sanguíneo cerebral permanece constante ao longo de uma faixa de pressão arterial e pressão intracraniana devido à auto-regulação da resistência vascular. O cérebro é um tecido que possui elevado metabolismo aeróbico, com o oxigênio, em vez do substrato metabólico, atuando como substância limitadora. O cérebro pode ser privado de

oxigênio por qualquer um de vários mecanismos: hipóxia funcional em um contexto de baixa pressão parcial de oxigênio inspirado, redução da capacidade de transporte de oxigênio ou inibição do uso de oxigênio pelo tecido; ou isquemia, seja transitória ou permanente, após a interrupção do fluxo circulatório normal. A cessação do fluxo sanguíneo pode resultar de uma diminuição da pressão de perfusão, como na hipotensão, ou de uma obstrução de pequenos ou grandes vasos (DIAS et al., 2000).

Quando o fluxo sanguíneo para uma parte do cérebro é reduzido, a sobrevida do tecido em risco depende de vários fatores modificadores: a disponibilidade de circulação colateral, a duração da isquemia e a magnitude e rapidez da redução do fluxo. Tais fatores determinam, por sua vez, o local anatômico preciso e o tamanho da lesão e, em consequência, o déficit clínico. Dois tipos principais de lesão isquêmica aguda são conhecidos: 1) a isquemia cerebral global (encefalopatia hipóxico-isquêmica) ocorre quando há redução generalizada da perfusão cerebral, como na parada cardíaca, choque e hipotensão grave; 2) a isquemia cerebral focal sucede a redução ou cessação do fluxo sanguíneo para uma área localizada do cérebro em virtude de doença de um vaso grande (como oclusão arterial embólica ou trombótica) ou de um vaso pequeno (como vasculite) (GIROLAMI et al., 2000).

1.1.5.1 Isquemia cerebral global (encefalopatia hipóxico-isquêmica)

Há uma hierarquia de células do SNC que mostram suscetibilidade preferencial à isquemia (vulnerabilidade seletiva). Os neurônios são as células mais sensíveis, embora as células gliais (oligodendrócitos e astrócitos) também sejam vulneráveis. Há ainda uma grande

vulnerabilidade na suscetibilidade de populações diferentes de neurônios em regiões distintas do SNC. Isto se baseia nas diferenças do fluxo sanguíneo cerebral regional e necessidades metabólicas celulares. Na isquemia cerebral global intensa, ocorre um infarto cerebral difuso, a despeito da vulnerabilidade regional. Os pacientes que sobrevivem nesse estado com freqüência permanecem com um déficit neurológico acentuado e em coma profundo – estado vegetativo persistente. Outros pacientes satisfazem os critérios clínicos de “morte encefálica”, incluindo evidências persistentes de lesão cortical difusa (eletroencefalograma isoelétrico) e lesão do tronco encefálico, como ausência de reflexos e do impulso respiratório, e perfusão ausente. Quando os pacientes com essa forma difusa de lesão são mantidos sob ventilação mecânica, o cérebro sofre gradualmente um processo autolítico, gerando um tecido desintegrado amolecido que não se fixa bem em formol e cora-se mal em corantes (EKMAN, 2000; GIROLAMI et al., 2000).

Ao exame macroscópico, o cérebro está edemaciado, os giros alargados e os sulcos estreitados. A superfície de corte mostra uma demarcação indistinta entre as substâncias branca cinzenta. As alterações histopatológicas que acompanham a lesão isquêmica irreversível (infarto) são agrupadas em três categorias. As alterações precoces ocorrem 12 a 24 horas após o insulto, incluem a lesão aguda das células neuronais (neurônios vermelhos) caracterizada, no início, por microvacuolização, depois eosinofilia do citoplasma neuronal e, depois, por picnose nuclear e cariorraxe. Alterações agudas semelhantes ocorrem, um pouco mais tarde, nos astrócitos e oligodendróglia. As células piramidais no setor de Sommer (CA1) do hipocampo, as células de Purkinje no cerebelo e os neurônios piramidais do neocôrtex são as mais susceptíveis a uma lesão irreversível. As alterações subagudas, que ocorrem após 24 horas a duas semanas, incluem necrose tecidual, influxo de macrófagos, proliferação vascular e gliose reativa. O reparo observado após duas semanas, caracteriza-se por remoção de todo o tecido necrótico, perda da estrutura do SNC normalmente organizada e gliose. No córtex cerebral, a perda neuronal e a

glioze produzem uma destruição desigual do neocôrte, com preservação de algumas camadas e envolvimento de outras – um padrão denominado necrose pseudolaminar (GIROLAMI et al., 2000).

Os infartos das zonas limítrofes (“linhas divisórias de irrigação”) são as áreas cuneiformes de infarto, as quais ocorrem nas regiões do cérebro e medula espinhal, situadas nos campos mais distais da irrigação arterial. Nos hemisférios cerebrais, a zona limítrofe entre as distribuições das artérias cerebrais anterior e média corre o maior risco. A lesão dessa região produz uma lesão parassagital linear (GIROLAMI et al., 2000).

1.1.5.2 Isquemia cerebral focal (infarto cerebral)

O tamanho, localização e forma do infarto e o grau de lesão tecidual que resulta da isquemia cerebral focal decorrente da oclusão de um vaso sanguíneo são determinados pelos fatores modificadores, principalmente pela adequação do fluxo colateral. A maior fonte de fluxo colateral é o Polígono de Willis (complementado pela via da artéria carótida externa-oftálmica). Um reforço parcial e inconstante está disponível na superfície do cérebro a partir dos ramos distais das artérias cerebrais anterior, média e posterior através de anastomoses corticoleptomeníngreas. Em contraste, há pouco ou nenhum fluxo colateral para os vasos penetrantes profundos que suprem estruturas como o tálamo, núcleos da base e substância branca profunda (EKMAN, 2000; GIROLAMI et al., 2000).

A aparência macroscópica de um infarto não-hemorrágico muda com o tempo. Durante as primeiras seis horas de uma lesão irreversível, pouco é observado. Após 48 horas, o

tecido torna-se pálido, mole e tumefacto, e a junção corticomedular torna-se indistinta. De dois a dez dias, o cérebro se torna gelatinoso e friável, e o limite antes mal definido entre o tecido normal e anormal adquire nitidez à medida que o edema resolve no tecido adjacente que sobreviveu. De dez dias a três semanas, o tecido se liquefaz, deixando, mais tarde, uma cavidade cheia de líquido revestida por tecido cinza escuro, que gradualmente se expande enquanto o tecido morto é removido (GIROLAMI et al., 2000).

Ao exame microscópico, a reação tecidual evolui dentro da seguinte seqüência: após as primeiras 12 horas, a alteração neuronal isquêmica e o edema citotóxico e vasogênico predominam. Há perda das características tintoriais habituais das estruturas de substâncias branca e cinzenta. As células endoteliais e gliais, principalmente astrócitos, se tumefazem e as fibras mielinizadas começam a desintegrar-se. Até 48 horas, a emigração neutrofílica aumenta progressivamente e cai. As células fagocíticas dos monócitos circulantes, histiocitos da adventícia e da micróglia ativada são evidentes após 48 horas e tornam-se o tipo celular predominante nas duas a três semanas seguintes. Os macrófagos estão repletos dos produtos de degradação da mielina ou sangue e podem persistir na lesão por meses a anos. À medida que o processo de liquefação e fagocitose prossegue, os astrócitos nas margens da lesão aumentam progressivamente, dividem-se e desenvolvem uma rede ampla de extensões protoplasmáticas. Os astrócitos reativos são encontrados desde uma semana após o insulto (GIROLAMI et al., 2000).

Após vários meses, o aumento acentuado do núcleo e citoplasma dos astrócitos cede. Na parede da cavidade, os processos astrocíticos formam uma rede densa de fibras gliais misturadas com novos capilares e algumas fibras de tecido conjuntivo perivascular. No córtex cerebral, a cavidade é separada das meninges e espaço subaracnóideo por uma camada gliótica de tecido, derivado da camada molecular do córtex. A pia-máter e a subaracnóide não são afetadas e não contribuem para o processo de resolução (GIROLAMI et al., 2000).

Um infarto incompleto ocorre na isquemia focal quando há necrose seletiva de neurônios com relativa preservação da glia e tecidos de sustentação (GIROLAMI et al., 2000).

1.1.6 Efeitos metabólicos da lesão encefálica

Quando o encéfalo é lesado, como no AVC, os neurônios privados de oxigênio por tempo prolongado morrem e não se regeneram. Infelizmente, a lesão não fica restrita aos neurônios privados de oxigênio. Evidência recente indica que esses neurônios são responsáveis pela morte dos neurônios adjacentes. Os neurônios privados de oxigênio liberam, por suas terminações axônicas, grandes quantidades de glutamato, um neurotransmissor excitatório. Concentrações excessivas de glutamato podem ser tóxicas para os neurônios, levando a morte celular. A excitação excessiva de um neurônio levando a morte celular é chamada excitotoxicidade (EKMAN, 2000).

O processo de excitotoxicidade começa com a fixação persistente do glutamato ao receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (tipo NMDA), na membrana celular. A estimulação desse receptor produz influxo de Ca⁺⁺ para a célula e, indiretamente, facilita a liberação desse íon pelos depósitos intracelulares de Ca⁺⁺. Os níveis excessivos de Ca⁺⁺ não podem ser removidos do citoplasma pelo seqüestro para os depósitos de armazenamento interno do retículo citoplasmático ou pelo transporte, para fora das células, por meio dos canais de membrana. Com o aumento da Ca⁺⁺, no interior da célula, mais K⁺ se difunde para fora da célula, exigindo aumento da glicólise, para prover energia para a bomba de Na⁺K⁺ trazer, ativamente, o K⁺ de

volta para a célula. Em conjunto, o aumento da glicólise e do Ca++ produz diversas consequências destrutivas para os neurônios (EKMAN, 2000).

A glicólise aumentada libera quantidades excessivas de ácido lático, baixando o pH intracelular e resultando em acidose, que pode degradar a membrana celular. Os níveis intracelulares elevados de Ca++ ativam as enzimas digestivas dependentes de cálcio, chamadas proteases. Esses processos ativados degradam as proteínas celulares. O Ca++ ativa enzimas que liberam o ácido aracídônico, produzindo substâncias que causam inflamação celular e produzem radicais de oxigênio livre. Esses radicais de oxigênio livres são partículas de oxigênio, dotadas de carga que são deletérias para o funcionamento mitocondrial na célula. Além dos efeitos diretos do Ca++, o afluxo de água associado ao influxo iônico também causa edema celular (STEHN-BITTEL et al, 1995).

Por fim, esses eventos celulares levam à morte celular e à propagação, em potencial, da lesão neural, se a célula que está morrendo liberar glutamato, excitando, excessivamente, suas células circunvizinhas (EKMAN, 2000).

Além dos possíveis tratamentos medicamentosos, por bloqueio dos receptores de glutamato do tipo NMDA para o controle de insulto isquêmico ao encéfalo, outros tratamentos podem ser direcionados especificamente para o bloqueio de cálcio e dos radicais livres (GISVOLD; STEEN, 1985).

1.2 ISQUEMIA ENCEFÁLICA EXPERIMENTAL

Experimentalmente, o estudo da isquemia cerebral em animais leva em conta três aspectos: 1) a extensão do cérebro que é submetida à isquemia, a qual pode ser focal ou global; 2) o intervalo de tempo durante o qual o cérebro sofre a isquemia podendo ela ser permanente ou transitória, e neste último caso pode ocorrer reperfusão pós-isquêmica e 3) a intensidade da isquemia, que pode ser classificada como completa ou parcial. Portanto, vários modelos são possíveis, quando esses diferentes aspectos são combinados. Por exemplo, alguns modelos empregados induzem a isquemia focal completa, com ou sem reperfusão. Estes modelos usualmente provocam uma necrose global ou infarto localizado. Outros modelos utilizados induzem isquemia global, habitualmente incompleta e transitória. Esta lesão afeta áreas cerebrais difusas, causando tipicamente alterações neuronais dentro de regiões vulneráveis (COLLI et al., 1998).

Existe uma variedade de espécies animais que são utilizadas em experimentos neurológicos. Algumas delas apresentam características funcionais que especialmente são favoráveis ao estudo pela sua semelhança à anatomia humana. Para a realização destes experimentos são utilizados animais como primatas, ratos, camundongos e outros roedores (COSTA, 2004).

1.2.1 Modelos de isquemia encefálica global experimental em ratos

As principais técnicas atualmente utilizadas para o estudo da isquemia cerebral experimental global em ratos são: isquemia do prosencéfalo por oclusão de dois vasos, a qual consiste da oclusão temporária das carótidas comuns, seguida de hipotensão arterial sistêmica (EKLÖF; STESJÖ, 1973; KAGSTRÖM et al., 1983); isquemia do prosencéfalo por oclusão de quatro vasos, a qual consiste da oclusão temporária de ambas as carótidas comuns, após oclusão permanente das artérias vertebrais (PULSINELLI, 1979; BLOMQVISTE et al., 1984); modelos de isquemia cerebral envolvendo hipertensão liqüórica através de isquemia por compressão de ambos os hemisférios cerebrais e compressão-isquemia de um só hemisfério (YOSHIDA et al., 1982; GINSBERG; BUSTO, 1989) e hipóxia-isquemia (preparação de Levine) e suas modificações (COLLI et al., 1998).

Pode-se citar como vantagens do método de isquemia do prosencéfalo por oclusão de dois vasos, o fato de o procedimento ser realizado em um só tempo cirúrgico, gerando isquemia de alto grau, a capacidade para controlar a ventilação de forma a proporcionar normoxia e normocarbia, a facilidade para recircular o cérebro, a capacidade para estudos em longo prazo, o baixo índice de falha experimental, seja por morte aguda ou por isquemia inadequada (EKLÖF; STESJÖ, 1973; KAGSTRÖM et al., 1983). A vantagem do método de isquemia do prosencéfalo por oclusão de quatro vasos inclui a aplicabilidade tanto ao animal acordado, quanto anestesiado (PULSINELLI, 1979; BLOMQVISTE et al., 1984) e o modelo com elevação da pressão liqüórica tem como vantagens o fato da não necessidade de craniotomia e microcirurgia, a possibilidade de reperfusão e a ausência de convulsões do animal experimental (YOSHIDA et al., 1982; GINSBERG; BUSTO, 1989).

As desvantagens do modelo de isquemia do prosencéfalo por oclusão de dois vasos incluem a necessidade de anestesia geral e de hipotensão controlada, pois o uso de anestésicos e drogas hipotensoras podem mascarar os resultados, o modelo não pode ser usado em animais acordados, não permitindo avaliar as alterações de comportamento que possam surgir imediatamente após a instalação da isquemia (EKLÖF; STESJÖ, 1973; KAGSTRÖM et al., 1983). No modelo de isquemia do prosencéfalo por oclusão de quatro vasos as dificuldades técnicas do procedimento, fazendo com que nem todos os trabalhos consigam resultados satisfatórios com este modelo, mesmo quando a raça Wistar padrão é empregada, é a principal desvantagem (PULSINELLI, 1979; BLOMQVISTE et al., 1984). O modelo com elevação da pressão líquórica apresenta as seguintes desvantagens: o procedimento necessita de mais de um tempo cirúrgico, a infusão de líquido encéfalo raquidiano artificial produz rino-liquíorréia, provavelmente por ruptura da lâmina crivosa, uma complicação que poderia eventualmente predispor a meningite, impedindo estudos na fase crônica da isquemia (YOSHIDA et al., 1982; BUSTO; GINSBERG, 1989).

1.2.2 Modelos de isquemia encefálica experimental em gerbils

Recentemente tem sido utilizado um roedor proveniente do deserto da Mongólia, gerbil (*Meriones unguiculatus*). A principal vantagem do modelo de oclusão carotídea em gerbils consiste no simples procedimento cirúrgico, permitindo que muitos animais sejam estudados, proporcionando vários estudos sobre intervenções terapêuticas que podem contribuir na modificação da mortalidade e morbidade de pacientes que sofreram AVC (GARCIA, 1984),

outras vantagens são: economicamente de baixo custo, os animais da mesma espécie são relativamente homogêneos, grande semelhança do ponto de vista anatomo-fisiológico cerebrovascular com outras espécies (inclusive a humana) e maior aceitação ética e ecológica (GINSBERG; BUSTO, 1989).

Modelos em gerbils têm sido amplamente utilizados para a investigação de isquemia cerebral experimental por oclusão unilateral ou bilateral da artéria carótida comum (ACC) (GINSBERG; BUSTO, 1989). A oclusão bilateral geralmente é fatal, enquanto a oclusão unilateral produz lesões isquêmicas e pequena porcentagem dos animais evolui para óbito dentro de 48 horas (LEVINE; PAYAN, 1966). Um outro modelo é a oclusão temporária bilateral das artérias carótidas por um período de 5 minutos (BABCOCK et al., 1993).

Levine e Payan (1966) investigaram os efeitos da oclusão da ACC em gerbils. Observaram que todos os dez animais submetidos à oclusão bilateral da ACC morreram em menos de quatro horas e que oito dos 40 animais submetidos à oclusão unilateral da ACC que apresentaram severas seqüelas neurológicas morreram em menos de 48 horas. A razão para a alta porcentagem de animais que apresentaram déficits neurológicos após oclusão unilateral da ACC foi, provavelmente, atribuída a variações na circulação cerebral. Os autores sugerem alteração no Polígono de Willis, mas nenhum estudo tinha ainda sido realizado sobre a anatomia vascular cerebral desta espécie.

Estudos histológicos subseqüentes em cérebros de seis gerbils realizados por Levine e Sohn (1969), revelaram ausência de artérias comunicantes posterior, que em outras espécies, conecta o sistema arterial carotídeo e o sistema arterial vertebro-basilar. Havia, entretanto, anastomose entre as artérias cerebrais anteriores.

Kahn (1972) demonstrou ausência de artérias comunicantes posterior na base do encéfalo de gerbil e notou que as artérias cerebrais anteriores se uniam para formar um único

vaso. Harrinson et al. (1973) examinaram dez espécies e notificaram que em nenhuma existia artéria comunicante posterior.

Berry e Henry (1975) descreveram em um experimento com 34 gerbils, grupos com características específicas que sobreviverão à oclusão unilateral da ACC: (1). Suscetível à isquemia, com ausência da comunicação entre circulação cerebral anterior e posterior. (2). Grupo resistente à isquemia, com canais anastomóticos entre as artérias cerebrais anteriores. Castro-Pacheco et al. (2001) evidenciaram em seu experimento que 30% dos gerbils apresentavam vasos comunicantes. Devido a variantes anatômicas encontradas em diferentes espécies de animais (inclusive a humana), pode-se explicar o fato de se encontrar artéria comunicante posterior em apenas alguns gerbils. Visto a alta porcentagem de gerbils não apresentarem comunicação entre a circulação anterior e posterior, é muito útil o modelo de isquemia em gerbils para o estudo de alterações histopatológicas, funcionais e para avaliar esquemas terapêuticos (CASTRO-PACHECO, 2001).

O modelo experimental no roedor gerbil é altamente suscetível a isquemia cerebral induzida pela ligação das artérias carótidas comuns (LEVINE; PAYAN, 1966). A técnica experimental consiste em: com o animal sob anestesia geral, é realizada uma incisão na região ventral do pescoço, a musculatura proximal é rebatida e dissecada dos nervos; uma ou duas artérias comuns são expostas e ocluídas. Uma ligação bilateral destas artérias freqüentemente é fatal, enquanto que uma ligação unilateral produz lesões isquêmicas no encéfalo (BERRY, 1975; CASTRO-PACHECO et al., 2001).

Em estudos experimentais realizados em gerbils, submetidos à oclusão unilateral da ACC, observam-se: infarto cerebral, edema no hemisfério ipsilateral, lesões que variam de necrose seletiva de neurônios piramidais no hipocampo a grande área enfartada no corpo estriado, córtex cerebral, hipocampo e diencéfalo e sinais de lesão neurológica como hemiparesia, vários

graus de não - responsividade, ptose palpebral, convulsões, alterações no comportamento motor exploratório, observados através da diminuição da atividade locomotora, da noção espacial, do equilíbrio e das atividades voluntárias e o andar em círculo (KAHN, 1972; BERRY, 1975; YANIGIHARA, 1978; GINSBERG; BUSTO, 1989; CASTRO-PACHECO, 2001).

1.2.3 Avaliação dos resultados da isquemia cerebral experimental

Vários métodos podem ser utilizados para avaliação da isquemia cerebral experimental, sendo os mais importantes os métodos clínicos, morfológicos e funcionais como a avaliação da simetria motora, pois os animais que sofreram lesão apresentaram hemiparesia, movimentos circulares, ptose palpebral, letargia e rotação vigorosa ao redor do seu eixo longitudinal (*rolling fits*) (BERRY, 1975); avaliação histopatológica e avaliação no campo aberto, observando atividade locomotora e comportamental dos animais (BAILEY et al., 1995).

1.2.3.1 Avaliação clínica

Bederson et al. (1986) desenvolveram um exame neurológico simples e de rápida aplicação, que permite classificar os animais de modo eficiente, com relação ao déficit neurológico em normais (grau 0), moderados (grau 1) e graves (grau 2 e 3).

Shiraishi e Simon (1989) usaram uma modificação da escala de Bederson et al. (1986) e classificaram os animais examinados em: grau 3 – sem déficit motor evidente; grau 2 – paresia definida com diminuição da resistência muscular, mas mantendo a capacidade de marcha; grau 1 – sem capacidade de marcha, movendo-se em círculos; grau 0 – incapaz de permanecer em pé.

Menzies et al. (1992) classificaram os animais numa escala de 0 a 4: grau 0 - sem déficit motor aparente; grau 1 – flexão da pata dianteira contralateral; grau 2 – diminuição da força de garra dianteira contralateral quando o animal é puxado pela cauda; grau 3 – movimentos espontâneos em todas as direções, com marcha em círculo só quando puxado pela cauda e grau 4 – marcha espontânea em círculo

1.2.3.2 Avaliação do comportamento motor

Embora seja ainda de difícil definição, o termo atividade exploratória é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só as respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas (BERLYNE apud BIRKE; ARCHER, 1983, p. 279).

O comportamento exploratório tem sido investigado em diversas espécies, desde insetos até macacos. Porém, os roedores continuam sendo os mais estudados. Nos roedores de laboratório, os comportamentos que levam a uma ampliação das informações obtidas pelo animal incluem o ato de cheirar (sniffing), movimentar as vibrissas, direcionar-se para um estímulo

particular, mergulhar a cabeça (head dipping), correr em círculos (taxa de ambulação), levantar-se nas patas posteriores (rearing) e auto-limpeza (grooming) (BLANCHARD et al., 1989).

Estudos de comportamento exploratório têm se baseado na exposição do animal a uma alteração ambiental discreta e localizada ou no confinamento a um ambiente nunca experimentado anteriormente. Esse novo ambiente pode ser um labirinto, um campo aberto ou outro tipo de aparelhagem. O campo aberto tem sido mais utilizado em estudos experimentais, podendo ser circular (arena circular), quadrado (open-field tradicional) ou com orifício no solo (hole board) (SCHMITT; HIEMKE, 1998).

Para a avaliação do comportamento motor do gerbil pós-isquemia encefálica experimental, a arena circular pode ser utilizada. A arena circular é confeccionada em acrílico transparente medindo 60 cm de altura. O assoalho, em fórmica branca, é delimitado em 12 partes, onde serão analisadas as freqüências das respostas comportamentais exploratórias. A utilização desse tipo de teste apresenta uma conveniência pela facilidade de registro comportamental, quando comparado ao estudo no ambiente natural (STEIN et al., 1994).

1.2.3.3 Análise histopatológica

As alterações observadas dependem fundamentalmente do tempo decorrido desde a instalação da isquemia até o sacrifício do animal. Na fase inicial observa-se apenas uma área de edema no local isquemiado, que se inicia minutos após a isquemia, e posteriormente o parênquima cerebral sofre um processo de atrofia decorrente da destruição celular que se verifica quando o animal é sacrificado vários dias após o fenômeno isquêmico (COLLI et al., 1998).

O exame histopatológico permite a avaliação da extensão da lesão hipóxica celular e o estudo da zona limítrofe, com ênfase nos fenômenos de reparação e cicatrização das lesões. Diferentes preparações podem ser feitas na dependência do material estudado (YOUNG; HEATH, 2000).

1.3 DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

Apesar do DMSO ser conhecido desde o século dezenove, devido ao seu uso nas indústrias madeireiras, suas propriedades biológicas passaram a ser estudadas apenas recentemente. Desde então tem sido usado para diversas aplicações clínicas e laboratoriais. Freqüentemente é utilizado como solvente em estudos biológicos e como veículo para terapia com drogas, porém apresenta grandes efeitos quando utilizado sozinho (SANTOS et al., 2003).

1.3.1 Propriedades físico-químicas do DMSO

DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, é uma molécula anfipática com um domínio altamente polar e dois grupos apolares, sendo solúvel nos meios aquoso e orgânico. Devido a suas propriedades físico-químicas, DMSO é um solvente muito eficiente para compostos insolúveis em água e é um varredor de íons hidrogênio (SANTOS et al., 1997).

Foi sintetizada em 1886, pelo russo Alexandre Stayzell. É uma molécula de baixo peso (78,13), conferindo-lhe por este motivo uma importante propriedade biológica, a de atravessar qualquer estrutura do ser vivo. O DMSO possui propriedades físico-químicas: ponto de ebulação a 189°C a 760mm/Hg, pressão de vapor 0,6 mm/Hg, propriedade exotérmica 60 cd/g, quando diluído em água. A tensão da superfície a 20°C é de 46,2 dyne/cm. O ponto de combustão é de 6,050cal/g. A viscosidade a 20°C é de 2473 CP. O seu maior grau de pureza é de 99,5% e congela ao ser colocado no freezer. Já a 50% não congela, sendo este um critério de qualidade. O dimetilsulfóxido é absorvido no local de aplicação e é distribuído aos tecidos, onde é oxidado em dimetilsulfona ou dimetilsulfuro e é eliminado nas fezes ou urina (MENDEZ, 2003).

1.3.2 Aplicações farmacológicas do DMSO

Propriedades farmacológicas e fisiológicas e seus efeitos não são completamente entendidos. Propriedades consideradas importantes para seus efeitos terapêuticos e tóxicos incluem: sua rápida penetração e aumento da penetração de outras substâncias através de membranas biológicas, efeito de varredor de radicais livres, efeitos sobre a coagulação (antagonismo da agregação plaquetária), atividade anticolinesterásica, efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e anestésico local (WOOD; WOOD, 1975; BRAYTON, 1986; KINGERY, 1997).

DMSO tem sido usado em várias situações terapêuticas em humanos. Em 1978 foi aprovado pelo United States Food and Drug Administration (FDA) para seu uso no tratamento da cistite intersticial, através de instilação intravesical (STOUT et al., 1995; PARKIN et al., 1997).

Tem sido usado com sucesso no tratamento das manifestações dermatológica, urinária, pulmonar, reumática e renal da amiloidose (MORASSI et al., 1989; IWASAKI et al., 1994; BURGESS et al., 1998; MC CAMMON et al., 1998). Devido a suas ações antiinflamatória e varredora de radicais livres, seu uso tem sido proposto em diversas doenças gastrintestinais, como na colite ulcerativa, no carcinoma de cólon e na pancreatite crônica induzida por álcool (SALIM, 1991; SALIM, 1992; SHIRLEY, 1978).

DMSO cruza a barreira hematoencefálica e tem sido efetivo no tratamento do edema cerebral traumático, reduzindo a pressão intracraniana (de la TORRE et al., 1973; IKEDA, 1990). Apresenta ação antipsicótica na esquizofrenia (SMITH, 1992) e tem sido sugerido para o tratamento da doença de Alzheimer (REGELSON; HARKINS, 1997).

Também tem sido usado no tratamento de desordens musculoesqueléticas e desordens reumatológicas apresentando efeito benéfico no tratamento da artrite reumatóide (MURAV'EV, 1986; ROSENSTEIN, 1999). Em doenças dermatológicas apresenta efeito benéfico no tratamento tópico do herpes zoster (SWANSON, 1985).

1.3.3 Toxicologia do DMSO

Adição de DMSO no sangue causa efeitos que variam de acordo com a concentração e método de administração. Em concentrações de 50% ou mais, há hemólise instantânea e precipitação de fibrinogênio. Injeções intravenosas de DMSO podem causar irritação local e necrose local, dependendo da concentração e freqüência. O dano ocorre rapidamente, especialmente em concentrações acima de 80%. Há reação inflamatória

perivascular e trombose. Injeção intra-arterial de 100% de DMSO produz lesão acentuada no endotélio e massas de aglutinação de células vermelhas (RUBIN, 1983). Injeções intravenosas em macacos de 3g/Kg em 40% de solução uma vez ao dia durante nove dias produziram um aumento transitório no ritmo respiratório e um aumento quatro vezes maior na diurese e hemólise de eritrócitos (de la TORRE et al., 1981).

Em quatro espécies estudadas (ratos, roedores, gatos e cachorros), doses de 2.5 a 8.9g/Kg de DMSO, administrado intravenosamente, são consideradas doses letais e os sintomas apresentados pelos animais foram semelhantes, entre eles, tremores, miastenia, prostração, convulsões transitórias, dispnéia, edema pulmonar, hemólise e hemorragia. Doses letais para administração de uma única dose oral é considerada entre 12.8 e 28.3 g/Kg em ratos, gatos e frangos e doses letais para administração de uma única dose subcutânea é considerada entre 12.5 e 20.5 g/Kg em ratos e roedores (RUBIN, 1983).

Administração oral em ratos Wistar de 2.5g/Kg uma vez ao dia por seis semanas evidenciou alguma degeneração no fígado e indicações de nefrite e dose de 1 a 5 g/Kg uma vez ao dia durante seis semanas produziu mudanças degenerativas no fígado e sinais de nefrite. Cachorros que receberam doses muito altas via oral tiveram lesão hepática e uma marcante hemorragia gastrointestinal. O estudo de biópsias hepáticas de ratos que administraram 2g/Kg de DMSO evidenciou capilares hepáticos preenchidos com hemácias hemolizadas (RUBIN, 1983).

Lesão renal geralmente consistia de leve necrose tubular, geralmente relacionada ao colapso provocado pelos produtos da hemólise. Não há nefrotoxicidade observada em pacientes humanos que receberam DMSO administrado por via intravenosa em concentrações terapêuticas de 1g/Kg em solução de 10 a 40%. O DMSO foi infundido de 30 minutos a 24 horas durante 3 dias. Houve evidências de hemólise intravascular e hemoglobinúria, mas não houve evidências de excreção tubular de beta-2-microglobulina, um sensível marcador de lesão tubular nefrotóxica.

Não houve mudanças na uréia, creatinina sanguínea, e tempo de clearance da creatinina, ou na função renal. Hemoglobinúria foi relacionada com a dose (MURTHER; BENNETT, 1980).

Efeitos tóxicos sistêmicos em humanos têm sido descritos após o tratamento com DMSO, como náusea, vômito, diarréia, hemólise, reações anafiláticas manifestadas por eritema e ocasionalmente broncoespasmo, hipertensão diastólica e sistólica, bradicardia, e raramente edema pulmonar e parada cardíaca (SANTOS et al., 2003).

Yellow et al. (1980) e Greenfield (1981) relataram reação tóxica em dois pacientes idosos que receberam DMSO via intravenosa para o tratamento de artrite (três doses diárias de 100g de DMSO a 20%). Em um paciente houve série deteriorização clínica, incluindo oligúria, tremor, hemólise e perda da consciência. Ambos os pacientes tiveram mudanças na aspartato transaminase, hidroxibutírico desidrogenase e creatino quinase sanguíneas e elevações na creatitina e uréia sanguíneas. Protrombina e tromboplastina tiveram tempos relativamente menores. Knott (1980) sugeriu que as ações tóxicas observadas eram devido à ação do DMSO como potencializador de outras drogas e que as reações poderiam ser devido a um aumento da toxicidade da quinina sulfato, indometacina ou fenotiazina, as quais os pacientes receberam ao mesmo tempo que o DMSO.

Na aplicação tópica, embora bem tolerado, pode causar queimação transitória local, eritema, edema e prurido (SANTOS et al., 2003). Isso pode ser resultado da significante eosinofilia atribuída à liberação de histamina cutânea pelo DMSO (RUBIN, 1983).

DMSO exibiu atividade mutagênica (lesão do DNA) em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Kapp e Eventoff (1980) injetaram DMSO em várias concentrações (1 a 100%, 5ml/Kg) intraperitonealmente em ratos Wistar e evidenciaram um aumento de 10% do número de células anormais da medula óssea femoral quando aplicado DMSO a 1% e um aumento de 70 % destas células anormais quando aplicado DMSO a 100%. A incidência de

células anormais foi maior em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle. Os autores sugeriram que o DMSO pode efetivamente alterar a integridade da estrutura do cromossomo no rato.

Um significante efeito colateral do DMSO é exalação de cheiro de alho e gosto de alho na boca devido à excreção pulmonar de pequena quantidade de DMSO como dimetilsulfona (SANTOS et al., 2003).

1.3.4 DMSO e neuroproteção

DMSO é altamente solúvel e se distribui por todo o corpo, inclusive o cérebro, muito rapidamente. Além disso, solubiliza muitos compostos lipofílicos, aumenta a penetração de muitas drogas no SNC e tem sido usado sozinho ou em combinação em estudos farmacológicos em isquemia cerebral em animais (SHIMIZU et al., 1997) e em humanos (KARACA et al., 2002).

Existem controvérsias a respeito dos efeitos do DMSO em isquemia cerebral. Estudos de Little et al. (1981), Little et al. (1983), McGraw (1983) e Weinstein et al. (1986) não apontam benefícios quanto ao tratamento com DMSO em isquemia cerebral, enquanto estudos de De la Torre (1983), De la Torre (1991), Sugita et al. (1993), Shimizu et al. (1997), Phillis et al. (1998) e Greiner et al (2000) apontam efeitos benéficos dessa terapêutica.

Sua principal ação biológica que poderia resultar em neuroproteção contra isquemia cerebral é a de varredor de radicais livres. O DMSO varre radicais hidroxil livres e a dimetilsulfona, seu metabólito, varre radicais livres de oxigênio (WOOD; WOOD, 1975). Visto

que alguns compostos antioxidantes, como a vitamina E, a vitamina C e o manitol podem exibir ação neuroprotetora (GISVOLD; STEEN, 1985), investigamos se o DMSO é um neuroprotetor contra isquemia cerebral em modelo experimental em gerbils.

A dose de DMSO não se encontra estabelecida nestes estudos. McGraw (1983) estudou altas dosagens de DMSO em gerbils (5g/Kg a 50% de solução 1 hora após cirurgia para isquemia e a cada 8 horas durante 72 horas), já Phillis et al. (1998) e Sugita et al. (1993) estudaram doses mais baixas de DMSO em gerbils, sendo 215 mg/Kg e 768 mg/Kg, respectivamente.

Visto a alta incidência do AVC e as seqüelas motoras-funcionais decorrentes da isquemia encefálica, formas terapêuticas adequadas para redução das alterações histopatológicos e clínicas tornam-se uma prioridade. Verifica-se que não há consenso entre os trabalhos realizados anteriormente sobre a eficácia do DMSO como neuroprotetor e doses utilizadas; poucos destes estudos utilizaram modelos experimentais de isquemia cerebral global em gerbils através da oclusão unilateral permanente da ACC; não foi encontrado na literatura sobre a repercussão da terapêutica com DMSO sobre comportamento motor, relacionando-o com resultados da análise histopatológica do encéfalo do animal.

2. OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo investigar as ações neuroprotetoras do DMSO, em duas dosagens diferentes, nas alterações clínico-comportamentais e histopatológicas do encéfalo de gerbils submetidos à isquemia cerebral experimental através da oclusão permanente da artéria carótida comum esquerda.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi previamente aprovado pela comissão de ética em pesquisa da Universidade de Franca por estar de acordo com os princípios éticos de pesquisa em animais (protocolo 019/05 - Anexo 1).

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados 46 roedores adultos da espécie *Gerbillus (Meriones unguiculatus)*, pesando entre 50 a 70g, provenientes do biotério da UNIFRAN. Os animais foram alojados neste biotério em gaiolas de polipropileno (20x19x35) forradas com serragem. Dos 46 animais, 3 morreram durante o procedimento de cirurgia e 13 morreram durante o período experimental. Os 30 animais que participaram de todo período experimental foram subdivididos em 5 grupos, sendo n = 6 em cada grupo.

Após a cirurgia para o procedimento de cirurgia cerebral definitiva, os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, dois a dois, com livre acesso à água e comida durante todo o experimento.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi utilizado o seguinte delineamento experimental:

Grupo I – Controle: animais não submetidos à cirurgia experimental, avaliação do comportamento motor no primeiro, segundo, terceiro e quarto dia.

Grupo II – Falso operado (Sham): animais submetidos à cirurgia experimental, sem oclusão da artéria carótida comum (ACC) esquerda, avaliação do comportamento motor no primeiro, segundo, terceiro e quarto dia. Eutanásia no 7º dia pós-cirurgia para análise histológica do encéfalo.

Grupo III – Isquemia não tratado: animais submetidos à cirurgia experimental, com oclusão da ACC esquerda, avaliação do comportamento motor no primeiro, segundo, terceiro e quarto dia. Eutanásia no 7º dia pós-cirurgia para análise histológica do encéfalo.

Grupo IV – DMSO I: animais que receberam 215mg/kg de DMSO a 10% trinta minutos antes de serem submetidos à cirurgia experimental, com oclusão da ACC esquerda, avaliação do comportamento motor no primeiro, segundo, terceiro e quarto dia. Eutanásia no 7º dia pós-cirurgia para análise histológica do encéfalo.

Grupo V – DMSO II: animais que receberam 645mg/kg de DMSO a 10% trinta minutos antes de serem submetidos à cirurgia experimental, com oclusão da ACC esquerda, avaliação do comportamento motor no primeiro, segundo, terceiro e quarto dia. Eutanásia no 7º dia pós-cirurgia para análise histológica do encéfalo.

3.3 APLICAÇÃO DO DMSO

Os animais do grupo IV receberam 215mg/kg de dimetilsulfóxido¹ diluído em salina 0,9% (concentração DMSO a 10%) e os do grupo V 645mg/kg diluído em salina 0,9% (concentração DMSO a 10%) por via intraperitoneal, 30 minutos antes da cirurgia experimental.

3.4 CIRURGIA EXPERIMENTAL

Os animais dos grupos III, IV e V foram anestesiados com cloridrato de tiletamina / cloridrato de zolazepam² (5mg/Kg) por via intraperitoneal. Após a anestesia ter se estabelecido, foi realizada tricotomia seguida de uma incisão na região ventral do pescoço (Figura 1A e 1B). Os tecidos subcutâneo e muscular foram divulsionados (Figura 1C) e a ACC esquerda foi exposta e ocluída por 10 minutos por meio de fio de sutura, a fim de se interromper o fluxo sanguíneo para o encéfalo (Figura 1D). Durante todo o tempo, a região foi irrigada com solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril para prevenir a desidratação tecidual. Uma checagem visual foi realizada para assegurar que o fluxo pelos vasos foi interrompido. Após 10 minutos o fio de sutura foi amarrado provocando uma oclusão definitiva e a pele foi suturada.

1)Dimetilsulfóxido P.A.; peso molecular 78, 13; 1 litro corresponde a aproximadamente 1,10 Kg de DMSO – Laboratório Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro.

2)Zoletil® 50 – Laboratório Virbac, São Paulo, São Paulo.

Para o grupo II (falso-operado), a cirurgia foi realizada sem oclusão da artéria. Para evitar infecção, após a cirurgia os animais receberam benzil penicilina benzatina³ (40.000 UI/Kg) por via intramuscular, e mantidos em aquecimento a 37°C até o completo retorno anestésico (BAYLEY et al., 1995).

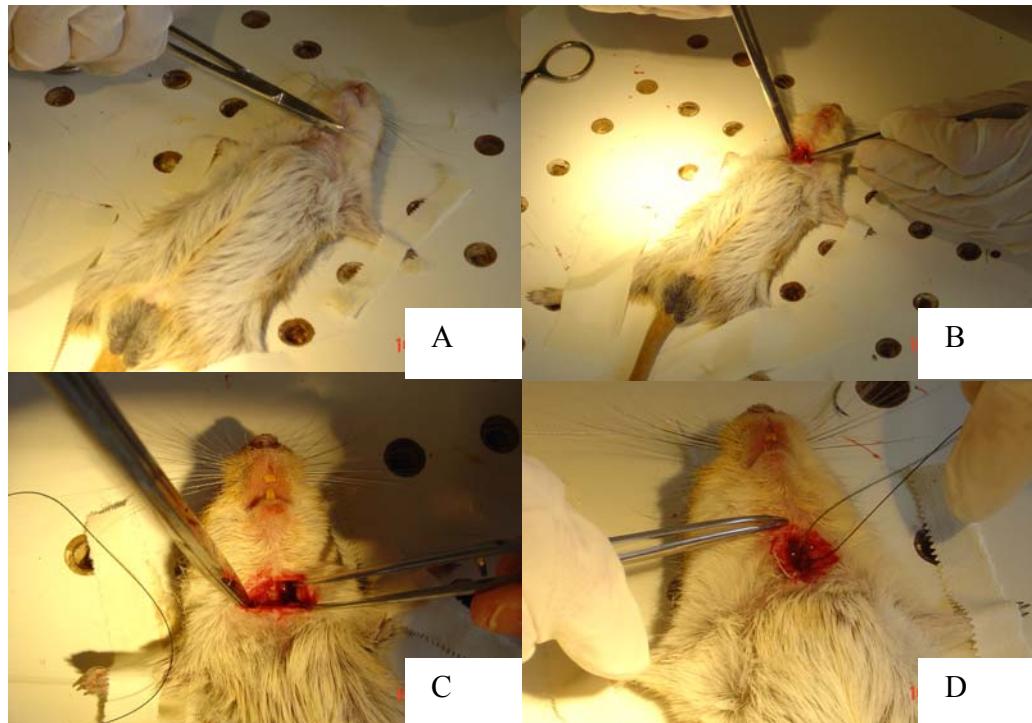


Figura 1 – Esquema demonstrativo da cirurgia experimental. A) Tricotomia B) Incisão na região ventral do pescoço C) Tecidos subcutâneo e muscular afastados D) Oclusão da ACC esquerda com fio de sutura.

3)Pencil B 600.000 UI - Laboratório Prodotti, São Paulo, São Paulo.

3.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR PÓS-ISQUEMIA

Avaliação clínica pós-isquemia foi realizada através da identificação da presença ou ausência de sinais de lesão neurológica de flexão da pata dianteira, diminuição da força de garra, andar em círculo (BEDERSON et al., 1986) e ptose palpebral (SOMOVA et al.; 2000).

Para avaliação do sinal de flexão da pata dianteira, o animal foi suspenso pela cauda. Sua reação normal seria estender ambas as patas dianteiras em direção ao solo. A avaliação da diminuição da força de garra foi realizada colocando o animal em uma superfície de papel, na qual pudesse agarrar com suas patas. Mantendo-se o animal seguro manualmente pela cauda, empurra-se o mesmo, até que as patas dianteiras escorregassem alguns centímetros. Os animais normais resistem ao empurrão agarrando o papel com ambas as patas. Para que o andar em círculo fosse observado, o animal movimentava-se livremente sobre a superfície (BEDERSON et al., 1986). A presença de ptose palpebral foi verificada através de checagem visual (SOMOVA et al.; 2000).

Nos quatro dias após a cirurgia experimental, os animais foram conduzidos à arena circular onde foram analisadas as respostas comportamentais exploratórias de cruzamentos e levantamentos. Os animais foram colocados um a um por um período de 5 minutos para a habituação ao local e nos próximos 30 minutos para avaliação do comportamento exploratório. Considerou-se um cruzamento (Figura 2A) quando o animal ultrapassava, com as quatro patas, um dos quadrantes do piso da arena. Foi considerado um levantamento (Figura 2B) quando o animal ficava em pé, apoiado nas duas patas traseiras. Durante os 30 minutos que o animal permanecia na arena, seu comportamento foi filmado, e posteriormente, as fitas de vídeo foram assistidas e analisadas.

A arena circular foi confeccionada em acrílico transparente medindo 60 cm de altura. O assoalho, em fórmica branca, foi delimitado em 12 partes, onde foram analisadas as freqüências das respostas comportamentais exploratórias (BIRKE; ARCHER, 1983).

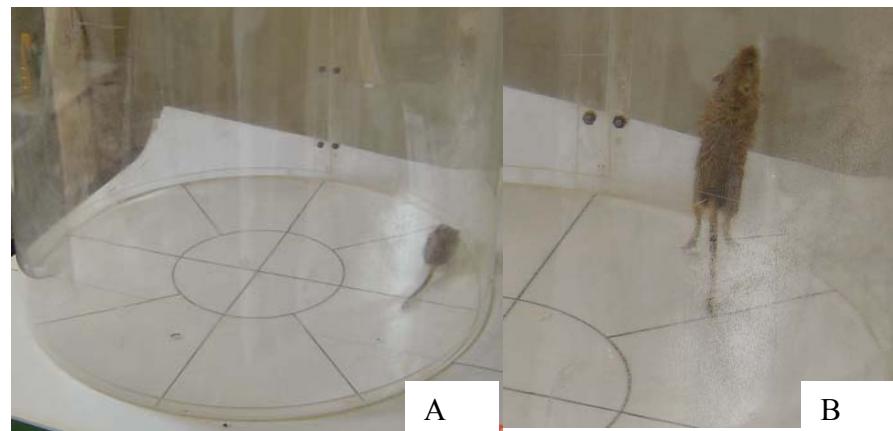


Figura 2 – Análise do comportamento exploratório na arena circular. A) Cruzamento B) Levantamento.

3.6 HISTOPATOLOGIA

Eutanásia foi realizada no 7º dia pós-isquemia (BAYLEY et al., 1995). Os animais foram anestesiados com tiopental sódico⁴ até atingir uma depressão respiratória letal. Em seguida uma incisão no tórax foi realizada, com exposição do mediastino. A aorta descendente torácica foi, então, clampeada e em seguida o coração foi liberado do envoltório pericárdio.

4) Thiopentax - Laboratório Cristália, Itapira, São Paulo.

O ventrículo esquerdo foi punctionado por meio de um equipo sanguíneo conectado a uma seringa de 60ml e em seguida uma incisão foi feita no átrio direito, quando então os encéfalos foram perfundidos com solução salina a 0,9%, seguida por solução de formaldeído a 10%. Em seguida, os encéfalos foram removidos e imediatamente emergidos em solução de formol a 10%. Após 48 horas, eles foram submetidos à desidratação em série crescente em álcool e xilol e embebidos em histosec (parafina especial). A microtomia foi realizada em micrótomo “Spencer 820” e obtidos cortes coronais em quatro micras de espessura. As amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) de modo habitual.

Os cortes realizados nos encéfalos seguiram o modelo proposto por Machado (1994) como visto nas figuras 3 e 4. Em seguida, foram analisadas ao microscópio de luz, e os sítios de lesão foram assinalados de acordo com Berry e cols. (1975).

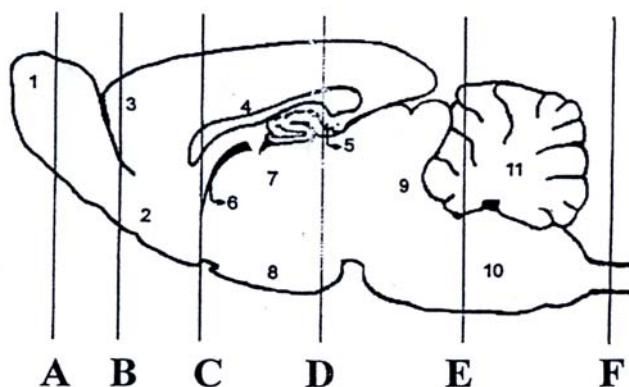


Figura 3 - Esquema de corte coronal do encéfalo e medula espinhal cervical de roedores. As linhas representam os planos cortados transversalmente. A) Bulbo olfatório, B) Fissura Rinal, C) Quiasma Óptico, D) Infundíbulo Hipofisário, E) Ponte e F) Medula Espinhal. Os números representam estruturas do encéfalo: 1) Bulbo olfatório, 2) Núcleo olfatório, 3) Côrtex cerebral, 4) Corpo caloso, 5) Hipocampo, 6) Terceiro ventrículo, 7) Tálamo, 8) Hipotálamo, 9) Mesencéfalo, 10) Ponte e 11) Cerebelo

Fonte – MACHADO, 1994

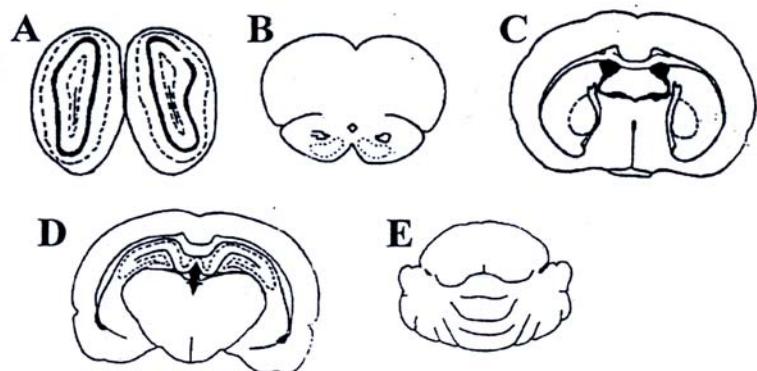


Figura 4 - Esquema dos cortes transversais de encéfalo de roedores. As letras correspondem aos planos de corte das linhas mostradas na figura acima.

Fonte - MACHADO, 1994

Os cortes histológicos se basearam nas linhas B, C, D e E. Dessa forma, foi possível analisar as áreas do córtex cerebral, hipocampo, tálamo, tronco cerebral e cerebelo.

Os cortes foram analisados em microscopia de luz e foi realizada a contagem das células com alterações isquêmicas no hipocampo. Foi avaliada a porcentagem dessas células em cinco campos microscópicos de grande aumento (Objetiva 40X).

3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados individuais de cada animal, obtidos através da avaliação do comportamento motor exploratório, foram transformados em médias dentro dos grupos

experimentais. Para a analise estatística foi utilizado o teste de variância de uma via (ANOVA), e quando mostradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, estas foram evidenciadas pelo teste “post-hock” de Tukey com valores de $p < 0,05$. Para a análise das porcentagens de células isquêmicas no hipocampo foi utilizado o test t de Student entre o grupo isquemia não tratado e grupos tratados com DMSO.

4. RESULTADOS

4.1 ÍNDICE DE MORTALIDADE

Dos 34 animais isquemeados, 3 morreram durante o procedimento de cirurgia, 13 morreram durante o período experimental e 18 sobreviveram. Dos 13 animais que morreram após a isquemia encefálica, 9 eram isquemeados não tratados (mortalidade de 60% dos animais), 3 isquemeados tratados com 215mg/kg de DMSO (mortalidade de 33,4%) e 1 isquemado e tratado com 645mg/kg de DMSO (mortalidade de 14,3%). Dos 18 animais que sobreviveram, 6 eram grupo isquemado, 6 eram do grupo tratado com 215mg/kg de DMSO e 6 eram do grupo tratado com 645mg/kg de DMSO (Figura 5).

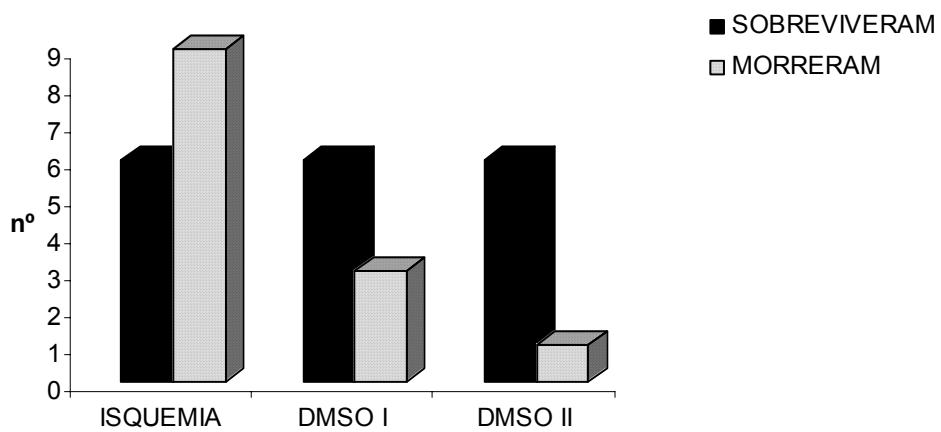


Figura 5 – Mortalidade após isquemia encefálica experimental. As colunas representam o número dos animais que sobreviveram ($n=18$) e que morreram ($n=13$) durante o período experimental nos grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II.

4.2 COMPORTAMENTO MOTOR PÓS-ISQUEMIA

Todos os animais submetidos ao procedimento de isquemia cerebral não tratados apresentaram sinais clínicos de lesão, como flexão da pata dianteira, diminuição da força de garra dianteira, marcha espontânea em círculo e ptose palpebral. Todos os animais tratados com DMSO apresentaram ptose palpebral após procedimento de isquemia. Manifestações clínicas de andar em círculos, diminuição da força de garra dianteira e flexão da pata dianteira foram evidenciadas em apenas 1 animal do grupo DMSO I (Figura 6 e 7).

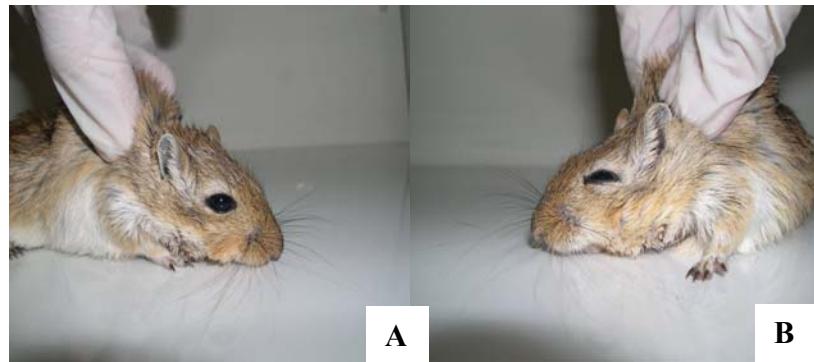


Figura 6 – Manifestação clínica (ptose palpebral) apresentada pelos animais submetidos à isquemia experimental. A) Olho direito sem sinal de lesão. B) Ptose do olho esquerdo.

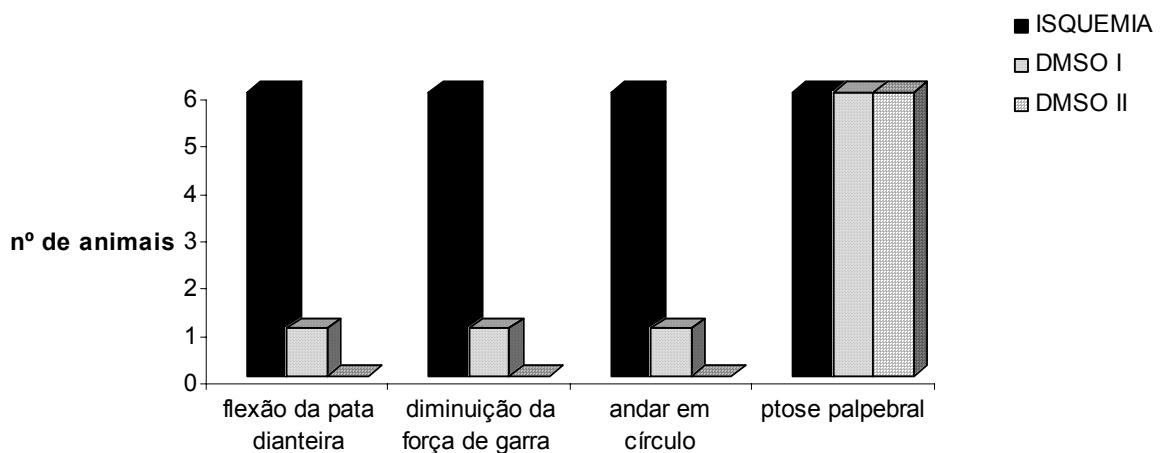


Figura 7 – Avaliação clínica após isquemia encefálica experimental. As colunas representam o número de animais que apresentaram manifestações clínicas de flexão da pata dianteira, diminuição da força de garra dianteira, marcha espontânea em círculo e ptose palpebral nos grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II.

Na análise da atividade exploratória de cruzamentos não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa intra-grupos ($p>0,05$), ou seja, entre as médias dos quatro dias de avaliação dentro de um mesmo grupo, para os grupos controle, falso operado (sham) e isquemia não tratado. Para o grupo DMSO I evidenciou-se aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) da freqüência do comportamento no 2º, 3º e 4º dias de avaliação em relação 1º dia. Para o grupo DMSO II evidenciou-se aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) da freqüência do comportamento no 4º dia de avaliação em relação 1º e 2º dias (Tabela 1).

Tabela 1 - Média \pm epm da freqüência de cruzamentos apresentados pelos animais dos grupos controle, falso operado (sham), grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II.

Grupos	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
Controle	502,33 \pm 35	454,17 \pm 48	442,83 \pm 47	455,83 \pm 41
Falso operado	385,17 \pm 12	353,33 \pm 42	452,33 \pm 85	433,50 \pm 42
Isquemia	156,83 \pm 37	231,50 \pm 54	180,50 \pm 27	247,50 \pm 38
DMSO I	353,50 \pm 81	512,83 \pm 73*	505,17 \pm 41*	542,67 \pm 35*
DMSO II	372,00 \pm 68	483,33 \pm 53	500,00 \pm 45	706,67 \pm 59**

* significância estatística intra-grupo em relação ao 1º dia de avaliação ($p<0,05$); ** significância estatística em relação ao 1º e 2º dias de avaliação ($p<0,05$).

Na comparação entre as médias dos cinco grupos a cada dia, verificamos uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) na freqüência de cruzamentos realizados pelos animais do grupo isquemia não tratado em relação ao grupo controle e grupo falso operado no 1º dia de avaliação. No 2º dia de avaliação verificamos uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) na freqüência de cruzamentos realizados pelos animais do grupo isquemia não tratados em relação aos grupos DMSO I e DMSO II. No 3º e no 4º dias de avaliação

verificamos uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) na freqüência de cruzamentos do grupo isquemia não tratado em relação ao grupo controle, grupo falso operado e grupos DMSO I e II. Não houve diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre os grupo DMSO I e II nos quatro dias de avaliação. Os animais tratados com DMSO não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) na freqüência de cruzamentos em relação ao grupo controle nos quatro dias de avaliação. Apenas no 4º dia o grupo DMSO II apresentou maior freqüência de cruzamentos em relação ao grupo falso-operado($p<0,05$), sendo que nos demais dias não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 8).

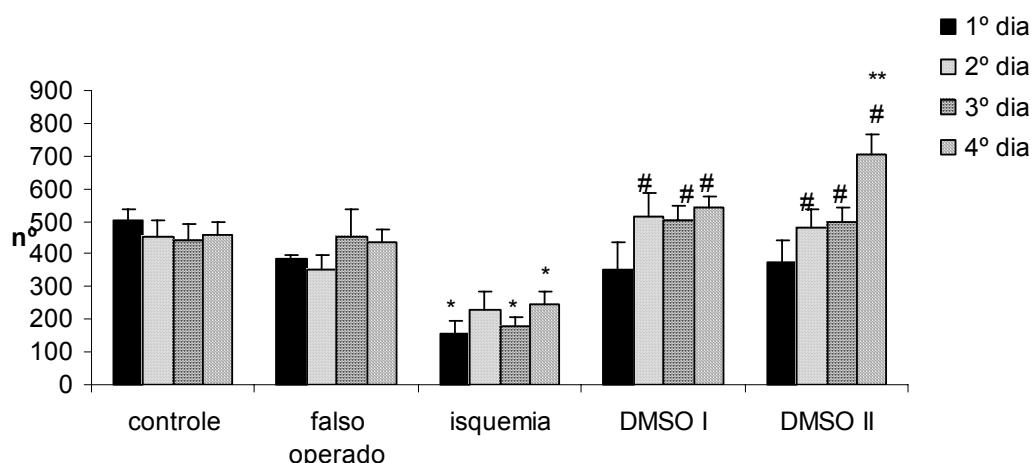


Figura 8 - Freqüências de cruzamentos apresentadas pelos animais dos grupos controle, falso operado (sham), grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II. As colunas representam as médias \pm epm. * significância estatística em relação ao controle e o falso operado ($p<0,05$); ** significância estatística em relação ao falso operado ($p<0,05$); # significância estatística em relação à isquemia ($p<0,05$).

Na análise da atividade exploratória de levantamento não foi evidenciado diferença estatisticamente significativa intra-grupos ($p>0,05$), ou seja, entre as médias dos quatro dias de avaliação dentro de um mesmo grupo, para os grupos controle e falso operado (sham). Para o grupo isquemia não tratado evidenciou-se aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) da freqüência do comportamento no 4º dia de avaliação em relação 1º dia. Para o grupo DMSO I evidenciou-se aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) da freqüência do comportamento no 4º dia de avaliação em relação 1º, 2º e 3º dias. Para o grupo DMSO II evidenciou-se aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) da freqüência do comportamento no 3º e 4º dias de avaliação em relação 1º dia (Tabela 2).

Tabela 2 - Média \pm epm da freqüência de levantamentos apresentados pelos animais dos grupos controle, falso operado (sham), grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II.

Grupos	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
Controle	255,33 \pm 32	251,67 \pm 13	275,50 \pm 23	298,50 \pm 31
Falso operado	191,67 \pm 9	185,67 \pm 25	275,67 \pm 64	261,67 \pm 41
Isquemia	50,83 \pm 16	72,50 \pm 15	68,00 \pm 18	103,67 \pm 19*
DMSO I	115,50 \pm 21	213,67 \pm 19	196,00 \pm 12	308,50 \pm 26**
DMSO II	143,33 \pm 27	259,17 \pm 32	273,33 \pm 43*	386,17 \pm 35*

* significância estatística intra-grupo com $p<0,05$ em relação ao 1º dia de avaliação; ** $p<0,05$ em relação ao 1º, 2º e 3º dias de avaliação.

Na comparação entre as médias dos cinco grupos a cada dia, verificamos uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) na freqüência de levantamentos realizados pelos animais do grupo isquemia não tratado em relação ao grupo controle, grupo falso operado e grupo DMSO II e entre os grupos DMSO I e DMSO II em relação ao grupo controle no 1º dia de

avaliação. No 2º dia de avaliação verificamos uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) na freqüência de cruzamentos realizados pelos animais do grupo isquemia não tratados em relação aos grupos controle, falso operado, DMSO I e DMSO II. No 3º dia de avaliação verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) na freqüência de cruzamentos do grupo isquemia não tratado em relação aos grupos controle, falso operado e DMSO II. No 4º dia de avaliação verificamos uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) na freqüência de cruzamentos do grupo isquemia não tratado em relação ao grupo controle, grupo falso operado e grupos DMSO I e II. Não houve diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre os grupo DMSO I e II nos quatro dias de avaliação. Apenas no 1º dia os grupos DMSO I e II apresentaram freqüência de levantamento inferior ($p<0,05$) em relação ao grupo controle. Nos demais dias não houve diferença estatisticamente significante ($p>0,05$) entre os grupos DMSO I e II em relação aos grupos controle e falso-operado (Figura 9).

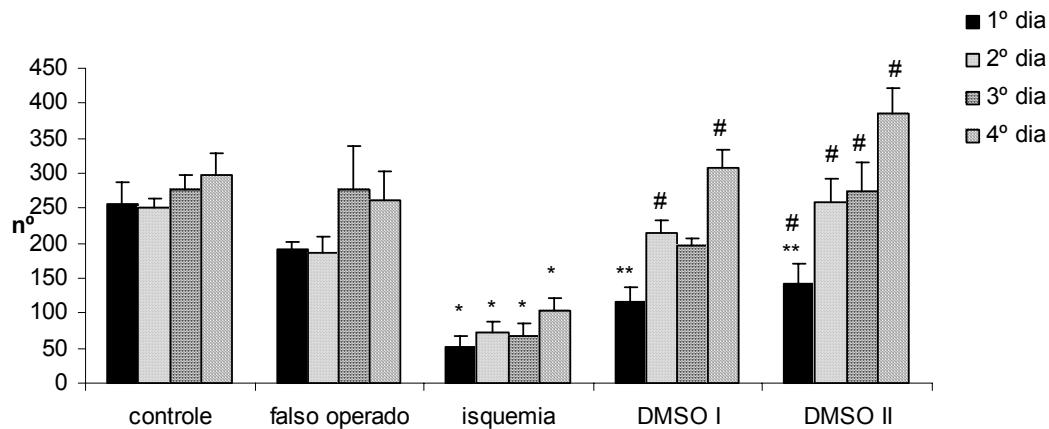


Figura 9 - Freqüências de levantamentos apresentadas pelos animais dos grupos controle, falso operado (sham), grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II. As colunas representam as médias \pm epm. * significância estatística em relação ao controle e o falso operado ($p<0,05$); ** significância estatística em relação ao controle ($p<0,05$); # significância estatística em relação à isquemia ($p<0,05$).

4.3 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Nos cortes histológicos dos encéfalos dos animais do grupo controle e do grupo falso-operado não foram encontrados sinais de lesão e morte celular.

Nos animais do grupo isquemia não tratado foram encontradas severas alterações no hemisfério cerebral esquerdo. As principais áreas comprometidas foram o hipocampo e córtex frontal, parietal e temporal. O exame histopatológico evidenciou no hipocampo de dois animais extensa área de malácia representada por necrose liqüefativa do parênquima, com presença de células *gitter* (macrófagos espumosos), vacuolização de neurônios e do neurópilo (Figura 10). Em apenas um dos animais foi observado a presença de manguito perivascular mononuclear. Nos encéfalos dos outros quatro animais observaram-se alterações isquêmicas menos intensas, principalmente no hipocampo, com áreas focais de isquemia neuronal ou de necrose seletiva de neurônios caracterizados por acidofilia, condensação e retração citoplasmática com núcleos em picnose e cariorrexe (Figura 11). Houve discretos focos de necrose seletiva neuronal em córtex e hipocampo contralateral. No cerebelo e tronco encefálico não foram observadas alterações microscópicas dignas de nota.

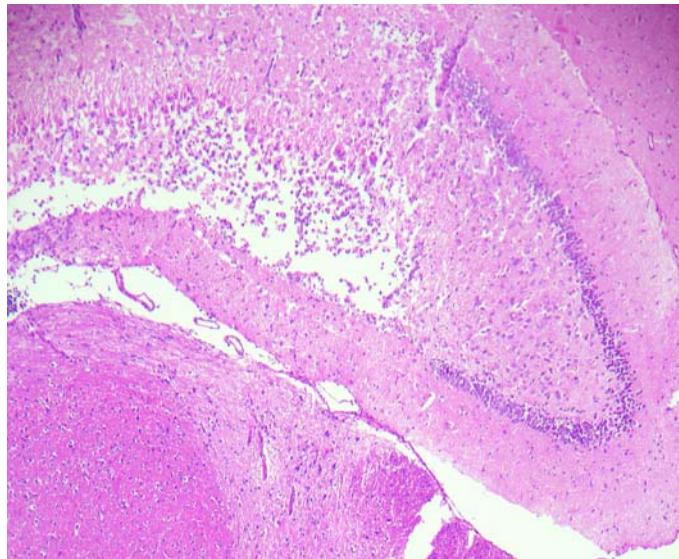


Figura 10 – Foco necrótico no hipocampo do grupo isquemia não tratado (HE – Objetiva (Obj) 10x).

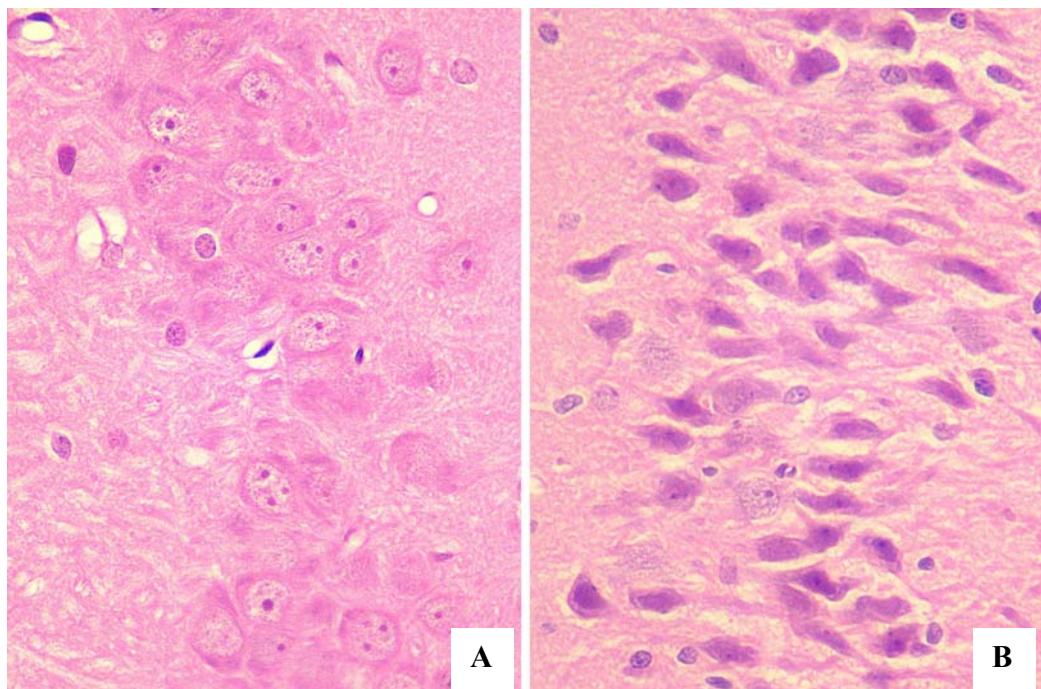


Figura 11 – Cortes histológicos do hipocampo. A) Grupo controle sem alterações morfológicas neuronais. B) Grupo isquemia não tratado com presença de células com alterações isquêmicas (HE – Obj. 40x).

Dos animais do grupo DMSO I, apenas um apresentou área extensa de infarto cerebral com características semelhantes às descritas para os animais isquemeados não tratados. Nos encéfalos dos demais animais (hemisfério esquerdo), o hipocampo apresentou focos discretos de necrose isquêmica com a presença característica de neurônios vermelhos (Figura 12A) e no córtex cerebral ocorreram pequenos focos de necrose seletiva neuronal na região frontal e parietal.

No grupo DMSO II não ocorreu nenhum caso de infarto cerebral. Houve pequenos focos de necrose seletiva neuronal envolvendo hipocampo e córtex cerebral frontal e parietal esquerdos. Estes focos foram menores e menos extensos no hipocampo quando comparado ao grupo DMSO I (Figura 12B). No córtex, a distribuição e extensão da lesão foram semelhantes entre os grupos DMSO I e DMSO II.

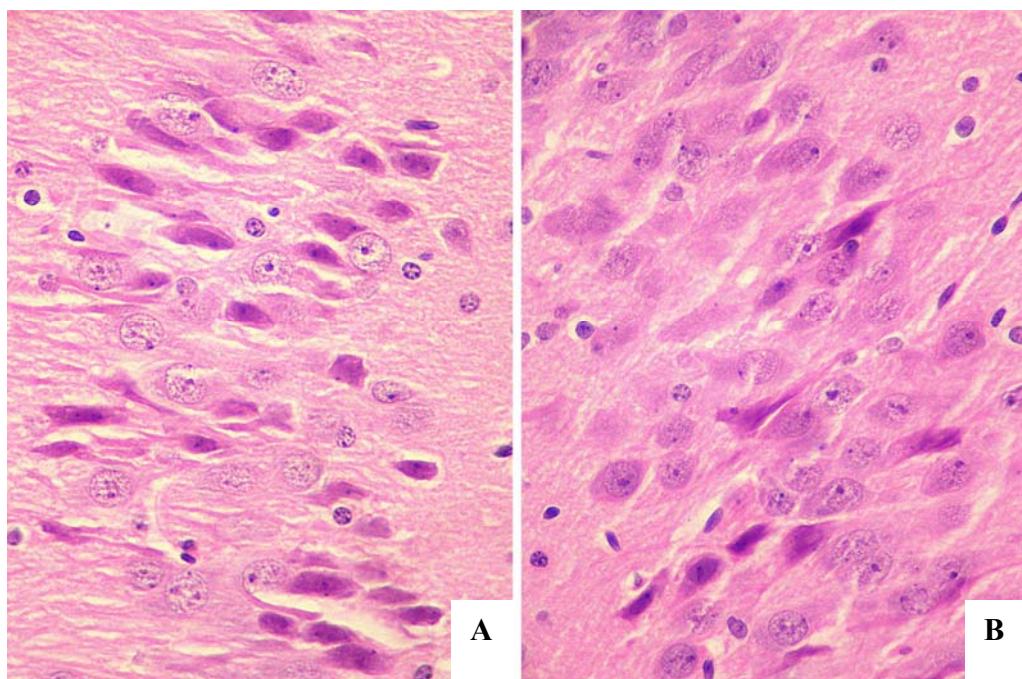


Figura 12 – Cortes histológicos do hipocampo. A) Grupo DMSO I com alterações morfológicas neuronais isquêmicas moderadas. B) Grupo DMSO II com alterações isquêmicas leves dos neurônios (HE – Obj. 40x).

A média \pm epm da porcentagem das células com alterações isquêmicas no hipocampo do grupo isquemia não tratado foi de $71,17\pm10,1$, do grupo DMSO I foi de $54,67\pm11,7$ e do grupo DMSO II foi de $46,17\pm3,4$. Evidenciou-se diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) da porcentagem de células isquêmicas no grupo DMSO II em relação ao grupo isquemia não tratado e em relação ao grupo DMSO I (Figura 13).

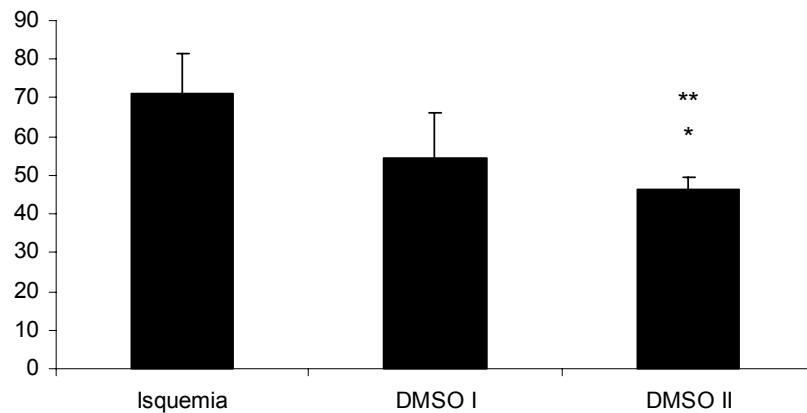


Figura 13 - Porcentagem de células isquêmicas no hipocampo apresentada pelos animais dos grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II. As colunas representam as médias \pm epm. * significância estatística em relação ao grupo isquemia não tratado. ** significância estatística em relação ao grupo DMSO I.

5. DISCUSSÃO

As doenças vasculares cerebrais são a terceira maior causa de óbito (após cardiopatia e câncer) no Brasil; é também o distúrbio neurológico mais prevalente em termos de morbidade e mortalidade (LESSA, 1999; LOTUFO, 2000). A crescente incidência de AVC nos últimos anos está relacionada com o nosso estilo de vida moderno: aumento no consumo de comidas gordurosas, fumo, estresse e sedentarismo. AVC resulta de um infarto cerebral isquêmico (atero-trombo-embolismo arterial) ou hemorragia intracerebral, geralmente como resultado de hipertensão (SOMOVA et al., 2000). Tratamento medicamentoso para lesão hipóxica-isquêmica cerebral é controverso. Classes de drogas têm sido estudadas para o tratamento da isquemia cerebral, como: bloqueadores de cálcio; anticonvulsivantes e drogas que deprimem o metabolismo cerebral; drogas que promovem microcirculação pós-isquemia; prostaglandinas e drogas que afetam a síntese de prostaglandina; e varredores de radicais livres (GISVOLD; STEEN, 1985).

Modelos em gerbils têm sido amplamente utilizados para a investigação de isquemia cerebral experimental por oclusão unilateral ou bilateral da ACC (GINSBERG; BUSTO, 1989). A oclusão bilateral geralmente é fatal, enquanto a oclusão unilateral produz lesões isquêmicas, sendo que uma porcentagem dos animais evolui para óbito dentro de 48 horas (LEVINE; PAYAN, 1966). Weinstein et al. (1986) provocaram isquemia fatal através da oclusão permanente bilateral das artérias carótidas em 14 gerbils, os quais foram tratados com 2,5g/Kg de DMSO administrado intraperitonealmente, destes, doze morreram. Sugerem nenhum efeito

protetor do DMSO contra isquemia fatal. Acreditamos que por ser um modelo de isquemia fatal por lesão global do SNC, a ação do DMSO não pode ser observada.

O modelo de oclusão unilateral da ACC esquerda interrompe o fluxo sanguíneo para o hemisfério cerebral esquerdo, sendo um modelo de isquemia semelhante ao infarto cerebral que ocorre em humanos (SOMOVA et al., 2000). Visto a alta porcentagem de gerbils ser suscetível à isquemia, devido à ausência da comunicação entre circulação cerebral anterior e posterior, o modelo de isquemia em gerbils é muito útil para o estudo de alterações histopatológicas e funcionais e para avaliar esquemas terapêuticos (CASTRO-PACHECO, 2001), sendo, então, adotado como modelo experimental para o presente estudo.

Dos animais submetidos à isquemia não tratados, 60% morreram nos sete dias seguintes à isquemia. Somova et al. (2000) estudaram modelo de isquemia encefálica em gerbils através de oclusão unilateral da ACC e evidenciaram mortalidade de 50% dos animais após isquemia experimental. Outros índices de mortalidade em modelos experimentais semelhantes encontrados na literatura são: 33% (BERRY et al., 1975), 53% (KAHN, 1972) e 65% (HARRISON et al., 1973).

A mortalidade pós-isquemia no grupo isquemiado tratado com 215mg/kg de DMSO foi de 33,4% e no grupo tratado com 645mg/kg de DMSO foi de 14,3% em relação ao índice de mortalidade de 60% observado no grupo isquemiado não tratado, evidenciando ação neuroprotetora do DMSO nesses animais e a maior efetividade da dose de 645mg/kg em relação à dose de 215mg/kg. Estudos apontam diminuição da mortalidade e morbidade após isquemia cerebral com o tratamento com DMSO (DE LA TORRE, 1983; DE LA TORRE, 1991; SUGITA et al., 1993; SHIMIZU et al., 1997; PHILLIS et al., 1998; GREINER et al., 2000), corroborando com os nossos resultados.

Escalas de avaliação clínica pós-isquemia, como as escalas de Bederson et al. (1986), Shiraishi e Simon (1989) e Menzies et al. (1992), são um exame neurológico simples e de rápida aplicação, que permite classificar os animais de modo eficiente, com relação ao déficit neurológico. Avaliam a flexão da pata dianteira, a diminuição da força de garra dianteira e a marcha espontânea em círculo. Embora o teste avalie o membro torácico do animal, de acordo com Bederson et al (1986) e Somova et al. (2000), esses exames neurológicos detectam a hemiparesia, ou seja, o acometimento dos membros torácico e pélvico de um hemicorpo. Não há testes específicos para que o membro pélvico de gerbils seja avaliado isoladamente. A ptose palpebral também pode ser avaliada por também ser um sinal de dano neurológico.

Todos os animais submetidos ao procedimento de isquemia cerebral não tratados apresentaram sinais clínicos de lesão. Esses sinais foram evidentes após algumas horas do procedimento e persistiram em todo o período experimental. Somova et al. (2000) evidenciaram que 100% dos animais submetidos à isquemia experimental apresentaram as manifestações clínicas de hemiparesia, ptose da pálpebra e andar em círculo, sendo que andar em círculo e ptose persistiram, respectivamente, 10 e 30 dias após lesão.

De acordo com Somova et al. (2000), a ptose da pálpebra sugere que o trato ótico do lado temporal do olho esquerdo, o qual não cruza o quiasma ótico e controla visão e movimento do olho esquerdo, foi comprometido em consequência da isquemia. Outra hipótese para o sinal clínico observado é a interrupção no trajeto da via simpática na cadeia simpática cervical podendo ter sido ocasionada pelo procedimento de cirurgia experimental, ocorrendo a síndrome de Horner, resultando em ptose, miose e anidrose, embora possa se apresentar isoladamente com ptose (GUYTON; HALL, 1996). Sugerimos que nos próximos estudos a acuidade visual dos animais também seja avaliada.

A hemiparesia observada sugere que a oclusão da ACC causou considerável, e provavelmente irreversível, lesão isquêmica no cérebro e tálamo (SOMOVA et al., 2000). O andar em círculo poderia ser resultado da alteração da performance motora e posturas anormais apresentadas pelos animais. Segundo Wahl et al. (1992), esses déficits podem ser atribuídos a lesões neuronais nas áreas sensoriomotoras cerebrais, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo na análise histopatológica, visto que os animais isquemados não tratados apresentaram lesões isquêmicas mais severas principalmente no hipocampo e córtex frontal e parietal.

Todos os animais isquemados não tratados que morreram após o procedimento de isquemia apresentaram crises convulsivas generalizadas tônico-clônicas, podendo ser considerado um sinal clínico de mau prognóstico.

Os animais tratados com DMSO apresentaram principalmente ptose palpebral após o procedimento de isquemia. Apenas um animal do grupo DMSO I apresentou os sinais clínicos de lesão assim como lesões isquêmicas mais severas. Sinais clínicos de flexão e diminuição da força de garra dianteira e andar em círculos não foram evidenciados nos demais animais tratados com DMSO, provavelmente devido a menor extensão da lesão observada nas áreas sensoriomotoras desses animais. Verificamos a ação neuroprotetora do DMSO em reduzir manifestações clínicas pós-isquemia.

O termo atividade exploratória é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só as respostas reflexas atencionais imediatas, como também as respostas voluntárias típicas (BERLYNE apud BIRKE; ARCHER, 1983, p. 279). O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que, no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele.

Dessa forma, a quantidade de movimento (taxa de cruzamentos) passa a ser um indicador de atividade exploratória. A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade do animal. (LAT apud BIRKE; ARCHER, 1983, p. 279). Os animais com lesão cerebral são rotineiramente avaliados na arena quanto à habilidade em adquirir e utilizar informação espacial, bem como para habituação à atividade exploratória com o decorrer do tempo (POUCET, 1989).

No presente estudo, os animais isquemeados não tratados apresentaram redução na atividade exploratória. Comportamentos de cruzamento e levantamento tiveram freqüência menor que o grupo falso-operado nos quatro dias subseqüentes a cirurgia experimental. Isso pode ser devido à extensa área de lesão nos animais isquemeados não tratados, a qual atingiu não só regiões do hipocampo fazendo com que o animal não habituasse, mas também outras estruturas que impediam que o movimento fosse realizado, como regiões corticais frontal, parietal e temporal. Le Peillet et al. (1988) também evidenciaram diminuição da atividade exploratória em ratos submetidos à isquemia cortical (telencéfalo). Wahl et al. (1992) evidenciaram fase de hiperatividade em ratos submetidos à isquemia encefálica por oclusão da artéria cerebral média direita e não evidenciaram esse comportamento em modelo de oclusão da artéria cerebral média esquerda, atribuindo o resultado a assimetrias anatômicas e fisiológicas do cérebro.

Além desses fatores, segundo Chandler et al. (1985), há relação entre duração da isquemia encefálica e mudanças na atividade exploratória. Em contraste à depressão psicomotora e subseqüente hiperatividade produzida por uma isquemia cerebral de 5 minutos, 1 minuto de oclusão da ACC não produziu alterações no comportamento exploratório quando comparado aos controles não lesados. Dois minutos de isquemia resulta em um efeito intermediário. Longos períodos de isquemia resultam em profunda depressão da atividade exploratória. Neste estudo, comportamento exploratório foi reduzido após 15 minutos de isquemia, sendo acompanhada de

lesões cerebrais globais. No presente estudo, os animais isquemeados não tratados também apresentaram redução da atividade exploratória, uma vez que foi utilizado um modelo de isquemia encefálica permanente e foi observado lesões isquêmicas globais. Os animais tratados com DMSO apresentaram comportamento exploratório semelhante aos grupos controle e falso-operado, evidenciando ação neuroprotetora do DMSO em relação a performance motora, mesmo quando oclusão permanente da ACC foi instituída.

Segundo Gerhardt e Boast (1988), aumento na atividade exploratória observada em animais submetidos a cinco minutos de oclusão da artéria carótida comum se correlaciona com morte seletiva de neurônios da região CA1 do hipocampo (BABCOCK et al., 1993). Apenas no 4º dia pós-isquemia os animais do grupo DMSO II apresentaram maior freqüência de cruzamentos em relação ao grupo falso-operado. Não foi observado, portanto, hiperatividade nos animais tratados com DMSO, sugerindo que as lesões no hipocampo observadas não causaram deficiência de memória do mapa espacial ou falta de habituação.

Os animais isquemeados tratados com DMSO apresentaram maior atividade exploratória de cruzamentos em relação ao grupo isquemia no 2º, 3º e 4º dias pós-lesão e apresentaram, também, aumento crescente na freqüência dos comportamentos de cruzamento e levantamento nos últimos dias de avaliação em relação ao primeiro. Segundo Wahl et al. (1992), nas primeiras 24 horas após a isquemia os animais estão se recuperando da cirurgia e estresse da oclusão. A maior freqüência de cruzamentos e levantamentos em relação ao grupo isquemado sugere efeito neuroprotetor do DMSO. As alterações histopatológicas menos severas decorrentes da isquemia correlacionam-se com o melhor comportamento motor observado nos grupos tratados com DMSO em relação ao grupo isquemado não tratado. Não foi observada diferença estatisticamente significativa nas freqüências de cruzamento e levantamento em relação ao grupo controle e falso-operado nos três primeiros dias pós-isquemia, sugerindo que os animais tratados,

apesar dos pequenos focos de lesão no hipocampo, não apresentaram déficit motor. DMSO, então, foi eficaz em reduzir área de lesão isquêmica e consequentemente permitir melhor atividade exploratória para esses animais.

A administração das duas doses de DMSO estudadas proporcionou efeito neuroprotetor em relação ao comportamento motor exploratório. Os estudos de Phillis et al. (1998) e Sugita et al. (1993) utilizaram doses de DMSO semelhantes às utilizadas no presente estudo, 215 mg/Kg e 768 mg/Kg, respectivamente. As doses de 215 mg/Kg (grupo DMSO I) e 645mg/kg (grupo DMSO II) demonstram resultados positivos sobre a mortalidade e morbidade desta terapêutica. Segundo Rubin (1983), em roedores, doses de 2.5 a 8.9g/Kg de DMSO, administrado intravenosamente, são consideradas doses letais e os sintomas apresentados pelos animais são tremores, prostração, convulsões transitórias, dispnéia, edema pulmonar, hemólise e hemorragia. McGraw (1983) conclui que o DMSO não era eficaz em reduzir mortalidade e morbidade após lesão cerebral isquêmica em gerbils, porém estudou altas dosagens de DMSO (5g/Kg a 50% de solução 1 hora após cirurgia para isquemia e a cada 8 horas durante 72 horas) e os animais apresentaram efeitos tóxicos, como edema pulmonar generalizado, necrose hepática e renal e linfadenite.

De acordo com Rubin (1983), doses letais para administração de uma única dose subcutânea é considerada entre 12.5 e 20.5g/Kg em roedores e injeções de DMSO podem causar irritação local e necrose local, dependendo da concentração e freqüência. Não foi observada, nos animais tratados com DMSO, irritação macroscópica no local da aplicação da droga. Podemos verificar, então, que as doses de DMSO utilizadas no presente estudo são muito menores do que as doses consideradas tóxicas e os animais tratados com DMSO aparentemente não apresentaram sinais de toxicidade.

Little et al. (1981) estudaram o efeito do DMSO sobre a evolução do infarto cerebral, submetendo vinte gatos adultos à oclusão da artéria cerebral média direita por 6 horas. Dez gatos não foram tratados e dez gatos receberam DMSO (2,5g/Kg i.v.) imediatamente após a oclusão. Alterações no fluxo sanguíneo cerebral na região de sylvius direita e padrões do eletroencefalograma foram similares entre os grupos tratado e não tratado. Tratamento com DMSO falhou em modificar o desenvolvimento do edema, alterações neuronais, alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Neste estudo o DMSO foi ineficaz em prevenir danos isquêmicos ou atuar quando lesão encefálica irreversível já tenha se estabelecido, visto que foi administrado após o procedimento de isquemia experimental. No presente estudo, os animais receberam DMSO antes do procedimento de isquemia encefálica experimental para que a neuroproteção do DMSO nos momentos iniciais da instalação da lesão pudesse ser testada.

A isquemia cerebral gera prejuízos comportamentais e morfológicos. Oclusões dos vasos que irrigam o cérebro resultam em grande prejuízo neuronal e morte de regiões sensíveis à isquemia. No modelo de isquemia através da oclusão unilateral permanente da ACC em gerbils há uma grande susceptibilidade de isquemia no telencéfalo e diencéfalo devido à ausência da comunicação posterior arterial (MILESON; SCHWARTZ, 1991). Segundo Corbett e Nurse (1998), nos modelos de isquemia global, as regiões CA1 e CA2 hipocampais, núcleo caudado dorsolateral e neurônios corticais parecem ser os mais afetados.

Verificamos no grupo isquemia não tratado que as células piramidais do hipocampo e os neurônios piramidais do neocôrtex foram os mais suscetíveis a lesão isquêmica no hemisfério esquerdo, sendo que dois animais apresentaram lesões graves, com extensas áreas comprometidas por infarto cerebral e os demais animais apresentaram áreas focais, múltiplas e aleatórias nestes locais. O hemisfério direito também apresentou lesões isquêmicas, em menor grau que o esquerdo, sugerindo que essas áreas também foram influenciadas pela ligação da ACC

esquerda. Esses animais apresentaram alto índice de mortalidade, sinais clínicos de hemiparesia e depressão da atividade exploratória. É importante ressaltar que a mortalidade de 60% dos animais isquemeados sugere que os animais com isquemia mais severa morreram.

De acordo com Ishibashi et al. (2003), em gerbils após isquemia encefálica através de oclusão da ACC, déficits cognitivos e sensoriomotores foram evidentes no período pós-isquemia, como assimetria no comportamento motor e diminuição no comportamento exploratório. Análise histológica revelou zona cortical de infarto rodeada por morte seletiva de neurônios no hemisfério cerebral. O volume da área enfartada no córtex motor primário, córtex somatosensorial e córtex visual se correlacionam com os resultados da avaliação das funções motoras e somatosensoriais dos animais, como foi observado no presente estudo.

Somova et al. (2000) evidenciaram após isquemia por oclusão unilateral da ACC esquerda em gerbils, necrose e autólise de células encefálicas gliais, células piramidais, astrócitos, axônios mielinizados e não mielinizados, e fagocitose após 10 e 30 dias da lesão isquêmica no hemisfério esquerdo. Edema intracelular discreto e algumas células picnóticas também foram evidenciados no hemisfério direito (contralateral a lesão).

Verificamos no grupo DMSO I focos discretos de necrose isquêmica envolvendo o hipocampo. No córtex cerebral houve pequenos focos de necrose seletiva neuronal na região frontal e parietal. No grupo DMSO II, estes focos foram menores e menos extensos no hipocampo, verificado através da reduzida porcentagem de células neuronais isquêmicas nesta região em relação aos animais isquemeados não tratados. Os animais tratados com o DMSO foram capazes de sobreviver, apresentando lesões encefálicas discretas, as quais não foram suficientes para alterar a atividade exploratória e produzir hemiparesia. Shimizu et al. (1997) também evidenciaram redução do volume de área enfartada em ratos Wistar tratados com 0.1, 0.3

e 1.0 ml de DMSO quando comparado aos controles que receberam apenas solução salina. Os resultados sugerem que o DMSO é neuroprotetor em isquemia cerebral.

Evidenciamos melhor efetividade da dose de 645 mg/Kg em relação à dose de 215mg/Kg de DMSO para reduzir número de células neuronais hipocampais lesadas. Corroborando com os resultados do presente estudo, Phillis et al. (1998) estudaram os efeitos do DMSO sobre a lesão isquêmica nas células piramidais CA1 hipocampais em gerbils. Isquemia foi realizada pela oclusão da ACC bilateral por 5 minutos seguida de reperfusão por 5 dias. A dose de 215 mg/Kg (2,8 mmol/Kg) de DMSO foi administrada intraperitonealmente 30 minutos antes da isquemia. Os animais controles, os quais receberam somente salina, apresentaram extensa lesão na região CA1 do hipocampo. Alguns cérebros apresentaram uma perda quase completa das células piramidais, os neurônios picnóticos, com núcleo condensado e mínimo citoplasma. Os gerbils tratados com DMSO apresentaram redução na extensão da lesão isquêmica nas células piramidais da região CA1 hipocampal.

De acordo com de la Torre (1983), evidências indicam que administração de DMSO pode interromper ou reverter isquemia cerebral após lesão clínica ou experimental. Quando a oferta de oxigênio e nutrientes para o tecido é deficiente (como na isquemia), lesão ou morte celular com todas as suas consequências patológicas podem ocorrer. Em animais, quando os níveis sanguíneos de oxigênio e glicose estão diminuídos pela oclusão do fluxo sanguíneo para o encéfalo, os níveis de um mensageiro intracelular, o trifosfato de inositol (IP_3), estão aumentados. O IP_3 estimula a liberação de Ca^{++} intracelular. Com atividade celular aumentada, na ausência de quantidade adequada de glicose, ocorre aumento de lactose, de radicais livres e de outros produtos finais do metabolismo, que são tóxicos às células. Também quando o IP_3 é degradado pela célula, seu produto associado, o diacilglicerol, é degradado a metabólitos de ácidos graxos livres, que também podem ser tóxicos à célula (EKMAN, 2000). O tratamento dos

animais isquemeados com o DMSO, no presente estudo, pode ter resultado no bloqueio da via do IP3 (de la TORRE, 1983), resultando na ação de reduzir as concentrações de cálcio intracelular (MICHEL, 1998; ZHANG; EYZAGUIRRE, 1999; CHOI et al., 1999; SANTOS et al., 2000), na ação de reduzir a formação de radicais hidroxil (SUGITA et al., 1993) e ainda na ação de varrer os radicais tóxicos de oxigênio em tecidos expostos aos fenômenos de isquemia (SANTOS et al., 1997; PHILLIS et al., 1998), e ação sobre o metabolismo lipídico atuando sobre os ácidos graxos formados (BELL, 1973; SAKURAGAWA, 1995) diminuindo, dessa forma, os danos decorrentes da isquemia cerebral.

Outras hipóteses para os resultados observados vem de encontro aos estudos de De la Torre et al. (1975), os quais relataram que, em macacos rhesus, DMSO melhora fluxo sanguíneo cortical dentro de 30 minutos e melhora fluxo sanguíneo da carótida dentro de um período de 10 minutos após a sua administração. De la Torre (1991) examinou se drogas que bloqueiam cálcio, prostaglandinas, radicais livres e liberação de endorfinas poderiam modificar fluxo sanguíneo cerebral ou patologia do tecido nervoso seguido de uma lesão cerebrovascular focal. Gatos foram submetidos à oclusão da artéria cerebral média e 1 hora após a oclusão receberam DMSO (0,9 g/Kg em 40% de solução); prostaciclina (200 ng.kg⁻¹.min⁻¹ por 60 minutos; ou DMSO e prostaciclina combinados. Prostaciclina mostrou um aumento modesto do fluxo sanguíneo cerebral, enquanto o DMSO promoveu proteção moderada de fibras catecolaminérgicas e aumentou 27% o fluxo sanguíneo cerebral após a oclusão. A combinação de DMSO e prostaciclina resultou em aumento significante da citoproteção das fibras catecolaminérgicas corticais e gerou um sustentável aumento de 68% do fluxo sanguíneo cerebral comparado com os valores do controle. Resultados sugerem que o efeito combinado do DMSO e prostaciclina podem ter efeito sinérgico na proteção de neurotransmissores corticais e fluxo sanguíneo cerebral após isquemia. O aumento do fluxo sanguíneo poderia facilitar a passagem de

nutrientes para a área isquêmica assim como aumentar a oxigenação tissular, elevando o efeito neuroprotetor do DMSO através de uma ação vasodilatadora.

Tem sido descrito que o DMSO diminui pressão intracraniana em modelos de lesão cerebral experimental em animais (McGRAW, 1983). Camp et al. (1981) verificaram que a dose de 1g/Kg de DMSO a 10% diminui significantemente a pressão intracraniana dentro de 5 minutos em coelhos submetidos à lesão criogênica. De la Torre et al. (1971) produziram compressão extradural supratentorial com um balão até que fosse observado apnéia, dilatação das pupilas, aumento sustentado da pressão intracraniana e pressão sanguínea e diminuição do fluxo sanguíneo da carótida em coelhos. O balão foi descomprimido após uma hora nos animais que sobreviveram ao procedimento. Um grupo destes animais foi, então, tratado com 2,2 g/Kg de DMSO e verificou-se que a pressão intracraniana dos animais retornaram aos seus níveis basais dentro de poucos minutos após a administração de DMSO. Brown et al. (1980) evidenciaram que o aumento da pressão intracraniana após lesão cerebral foi diminuído com DMSO, resultando em maior pressão sanguínea, maior pressão de perfusão cerebral, maior fluxo sanguíneo e maior metabolismo oxidativo em comparação aos animais não tratados ou tratados com manitol.

Laha et al. (1978), utilizando um modelo experimental de lesão cerebral através de embolismo da artéria cerebral média em cachorros, relataram que baixas doses de DMSO e metilprednisolona apresentam efeitos neuroprotetores. Verificaram que, nos animais controles, o tamanho da área de infarto cerebral era em média 1.45cm. Já os animais tratados com DMSO (2g/Kg) ou metilprednisolona (2mg/Kg) não apresentaram áreas de infarto cerebral, evidenciando a ação antiinflamatória do DMSO sobre a lesão cerebral isquêmica.

DMSO diminui a agregação plaquetária e isso poderia desagregar as plaquetas nos vasos sanguíneos, aumentando fluxo sanguíneo e diminuindo lesão isquêmica cerebral (ROSENBLUM; EL-SABBAN, 1982). Little (1974) relatou que DMSO poderia prevenir a

liberação de enzimas lisossomais em células nervosas submetidas à isquemia, estabilizando a membrana lisossomal. Ações de estimulação do centro respiratório e capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica também têm sido relatadas como propriedades importantes do DMSO envolvidas com seu potencial de neuroproteção. Ação diurética do DMSO proporciona redução do edema cerebral pós-isquemia (de La TORRE; SURGEON, 1973). Esses estudos relacionam importantes mecanismos de ação do DMSO, os quais podem estar relacionados com os resultados obtidos no presente trabalho.

CONCLUSÃO

A reduzida mortalidade pós-isquemia bem como o melhor comportamento motor exploratório e a reduzida porcentagem de células neuronais hipocampais isquêmicas sugerem um efeito neuroprotetor do DMSO frente ao modelo experimental utilizado, evidenciando melhores resultados utilizando a dose de 645mg/kg em relação à dose de 215mg/kg de DMSO.

As alterações histopatológicas menos severas decorrentes da isquemia correlacionam-se com o melhor desempenho motor observado nos grupos tratados com DMSO, desempenho semelhante ao observado nos animais controles e falso-operados.

REFERÊNCIAS

BABCOCK, A.M.; DAVID, A.B.; LOVEC, R. Locomotor activity in the ischemic gerbil. *Brain Research*, n. 625, p. 351-354, 1993.

BAYLEY, S.J.; WOOD, N.I.; SAMSON, N.A.; ROTHAUL, A.L.; ROBERTS, J.C.; KING, P.D.; HAMILTON, T.C.; HARRISON, D.C.; HUNTER, J. Failure of isradipine to reduce infarct size in mouse, gerbil, and rat models of cerebral ischemia. *Stroke*, n. 26, p. 2177-2183, 1995.

BEDERSON, J.B.; PITTS, L.H.; TSUJI, M.; NISHIMURA, M.C.; DAVIS, R.L.; BARTKOWSKI, H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*, n. 17, p. 472-476, 1986.

BELL, F.P. Transfer of cholesterol between serum lipoproteins, isolated membranes, and intact tissue. *Exp Mol Pathol*, n. 19, p. 293–303, 1973.

BERRY, K.; HENRY, K.M. On the relationship of brain vasculature to production of neurological deficit and morphological changes following acute unilateral common carotid artery ligation in gerbils. *J. Neurol Sci*, n. 25, p. 75-92, 1975.

BIRKE, K.; ARCHER, J. Some issues and problems in the study of animal exploration. In: BIRKE, K.; ARCHER, J. *Exploration in animals and humans*. University Press: Cambridge, 1983, p. 279.

BLANCHARD, D.C.; HORI, K.; RODGERS, R.J.; HENDRIE, C.A.; BLANCHARD, R.J. Attenuation of defensive threat and attack in wild rats (*Rattus rattus*) by benzodiazepines. *Psychopharmacology*, v.97, p. 392 – 401, 1989.

BLOMQVISTE, P.; MABE, H.; INGVAR, M.; STESJÖ, B.K. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. *Acta Neurol Scand*, n. 69, p. 376-384, 1984.

BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet*, ano 1, n. 76, p. 61-90, 1986.

BURGESS, J.L.; HAMNER, A.P.; ROBERTSON, W.O. Sulfhemoglobinemia after dermal application of DMSO. *Int J Dermatol*, n. 37, p. 949–54, 1998.

BUSTO, R.; GISBERG, M.D. Graded focal cerebral ischemia in the rat by unilateral carotid artery occlusion and elevated intracranial pressure: hemodynamic and biochemical characterization. *Stroke*, n. 16, p. 466-467, 1985.

CAMP, P.E.; JAMES, H.E.; WERNER, R. Acute dimethyl sulfoxide therapy in experimental brain edema. *Neurosurgery*, n. 9, p. 28-33, 1981.

CASTRO-PACHECO, A.; FOYO-NIEMBRO, E.; PÉREZ-PÉREZ V.; GARCÍA-HERNÁNDES, J.; GRIJALVA, I. Comunicación arterial carotidobasilar em gerbos (*Meriones unguiculatus*). *Rev Neurol*, ano 3, n. 32, p. 225-228, 2001.

CHANDLER, M.J.; DELEO, J.; CARNEY, J.M. An unanesthetized-gerbil model of cerebral ischemia-induced behavioral changes. *Journal of Pharmacological Methods*, n. 14, p. 137-146, 1985.

CHAVES, M.L.F. Acidente vascular encefálico: conceituação e fatores de risco. *Rev Bras de Hipertensão*, ano 4, n. 7, p. 372-382, 2000.

CHOI, S.Y.; CHAE, H.D.; PARK, T.J.; HA, H.; KIM, K.T. Characterization of high affinity neurotensin receptor NTR1 in HL-60 cells and its down regulation during granulocytic differentiation. *Br J Pharmacol*, n. 126, p. 1050-6, 1999.

COLLI, B.O.; SILVA, N.M.; CARLONI, C.G. Isquemia cerebral experimental. In: SILVA, O.C.; ZUCOLOTO, S.; BEER, A. *Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia*. São Paulo: Editora Probel. cap 65, 1998, p. 644-645.

CORBETT, D.; NURSE, S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Progress in Neurobiology*, n. 54, p. 531-548, 1998.

COSTA, V.B.B. *Abordagem fisioterapêutica em portadores de seqüelas de acidente vascular cerebral: a importância da implantação e utilização de um modelo experimental de isquemia em gerbils*. 2004. 111 f. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, Franca.

DENENBERG, V.H. Open-field behaviour in the rat: what does it mean? *Ann N Y Acad Sci*, n. 159, p. 852-859, 1969.

de la TORRE, J. C. Role of dimethyl sulfoxide in prostaglandin-thromboxane and platelet systems after cerebral ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, ano 1, n. 411, p. 293-308, 1983.

de la TORRE, J.C. Synergic activity of combined prostacyclin: dimethyl sulfoxide in experimental brain ischemia. *Can J Physiol Pharmacol*; ano 2, n. 69, p. 191-8, 1991.

de la TORRE, J.C.; SURGEON, T.E.; WOLLMAN, R. Subacute toxicity of intravenous dimethyl sulfoxide in rhesus monkeys. *J Toxicol Environ Health*, n. 7, p. 49-57, 1981.

de la TORRE, J.C.; ROWED, D.W.; KAWANAGA, H.M.; MULLAN, S. Dimethyl sulfoxide in the treatment of experimental brain compression. *Neurosurg*, n. 38, p. 345-352, 1973.

de la Torre, J.C.; KAWANAGA, H.M.; JOHNSON, C.M.; GOODE, D.J.; KAJIHARA, K.; MULLAN, S. Dimethyl sulfoxide in central nervous system trauma. *Ann N Y Acad Sci*, ano 27, n. 243, p. 362-89, 1975.

DIAS, L.A.A.; COLLI, B.O.; NETTO, J.C.; LACHAT, J.J. Avaliação da isquemia cerebral focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e a ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. *Arq Neuropsiquiatr*, ano 4, n. 58, p. 1047-1054, 2000.

DOBKIN, B.H. Economic impact os stroke. *Neurology*, suppl. 1, n. 45, p. 56-59, 1995.

EGORIN, M.J.; ROSEN, D.M.; SRIDHARA, R.; SENENBRENNER, L.; FOX, M.C. Plasma concentrations and pharmacokinetics of dimethyl sulfoxide and its metabolites in patients undergoing peripheral blood stem cell transplants. *J Clin Oncol*, n. 16, p. 610-5, 1998.

EKLÖF, B.; STESJÖ, B.K. Cerebral blood flow in ischemia caused by carotid artery ligation inthe rat. *Acta Physiol Scand*, n. 87, p. 69-77, 1973.

EKMAN, L.L. Neuroplasticidade. In: *Neurociência: fundamentos para reabilitação*. Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, 2000. cap. 4, p.45-54.

FUCHS, S.C.; LESSA, J.R.; NUNES, A.H. Hipertensão arterial sistêmica e acidente vascular encefálico: a magnitude do risco. *Revista Brasileira Hipertensão*, ano 4, n. 7, p. 347-349, 2000.

FUKUJIMA, M.M.; MARTINEZ, L.R. Dislipidemia e acidente vascular isquêmico. *Rev Soc Cardiol do Estado de São Paulo*, ano 4, n. 9, p. 529-561, 1999.

GARCIA, J.H. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke*, n. 15, p. 5-14, 1984.

GERHARDT, S.C.; BOAST, C.A. Motor activity changes following cerebral ischemia in gerbils are correlated with the degree of neuronal degeneration in hippocampus. *Behav Neurosci*, n. 102, p. 301-303, 1988.

GINSBERG, M.D.; BUSTO, R. Rodent Models of ischemia. *Stroke*, n. 20, p. 1627-1642, 1989.

GIROLAMI, U.; ANTHONY, D.C.; FROSCH, M.P. Sistema nervoso central. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Robbins: patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

GISVOLD, S.E.; STEEN, P.A. Drug therapy in brain ischaemia. *Br J Anaesth.*, n. 57, p. 96-109, 1985.

GREENFIELD, D. Dimethylsulphoxide toxicity. *Lancet*, n. 1, p. 276-277, 1981.

GREINER, C.; SCHMIDINGER, A.; HÜLSMANN, S.; MOSKOPP, D.; WÖLFER, J.; KÖHLING, R.; SPECKMANN, E.J.; WASSMANN, H. Acute protective effect of nimodipine and dimethyl sulfoxide against hypoxic and ischemic damage in brain slices. *Brain Res*, ano 2, n. 887, p. 316-22, 2000.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Neurofisiologia central da visão. In: *Tratado de Fisiologia Médica*. São Paulo: Guanabara Koogan, 1996. cap. 51, p. 599-600.

HARRISON, M.J.G.; SEDAL, L.; ARNOLD, J.; ROSS, R.W.I. No-reflow phenomenon in the cerebral circulation of the gerbil. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, n. 38, p. 1190-1193, 1975.

HARRISON, M.J.G.; BROWNBILL, D.; LEWIS, D.; RUSSEL, W.R. Cerebral edema following carotid artery ligation in gerbil. *Arch Neurol*, n. 28, p. 389-391, 1973.

ISHIBASHI, S.; KUROIWA, T.; ENDO, S.; OKEDA, R.; MIZUSAWA, H. Neurological dysfunctions versus regional infarction volume after focal ischemia in mongolian gerbils. Stroke, n. 34, p. 1501-1506, 2003.

IKEDA, Y.; LONG, D.M. Comparative effects of direct and indirect hydroxyl radical scavengers on traumatic brain oedema. Acta Neurochir Suppl n. 51, p.74-6, 1990.

IWASAKI, T.; HAMANO, T.; AIZAWA, K.; KOBAYASHI, K.; KAKISHITA, E. A case of pulmonary amyloidosis associated with multiple myeloma successfully treated with dimethyl sulfoxide. Acta Haematol, n. 91, p. 91-4, 1994.

JEZEK, D.; SCHULZE, W.; KALANJ-BOGNAR, S.; VUKELIC, Z.; MILAVEC-PURETIC, V.; KRHEN, I. Effects of various cryopreservation media and freezing– thawing on the morphology of rat testicular biopsies. Andrologia, n. 33, p. 368–78, 2001.

KAGSTRÖM, E.; SMITH, M.L.; STESJÖ, B.K. Receirculation in the rat brain following incomplete ischemia in the rat. Acta Physiol Scand, n. 118, p. 281-291, 1983.

KAHN, K. The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. Neurology, n. 22, p. 510-515, 1972.

KAPP, R.W.; EVENTOFF, B.E. Mutagenicity of dimethylsulfoxide (DMSO). Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis, n. 1, p. 141-145, 1980.

KARACA, M.; KILIC, E.; YAZICI, B.; DEMIR, S.; de la TORRE, J.C. Ischemic stroke in elderly patients treated with a free radical scavenger-glycolytic intermediate solution: a preliminary pilot trial. Neurol Res. 2002 Jan;24(1):73-80.

KINGERY, W.S. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. Pain, n. 73, p. 123–39, 1997.

KNOTT, L. Safety of intravenous dimethylsulphoxide. Lancet, ano 2, n. 8207, p. 1299-1305, 1980.

JACOB, S.W.; HERSCHLER, R. Pharmacology of DMSO. Cryobiology, ano 1, n. 23, p. 14-27, 1986.

LAHA, R.K.; DUJOVNY, B.J.; BARRIONUEVO, S.C.; DECASTRO, H.R.; HELLSTROM, J.C. Protective effects os methyl prednisolone and dimethyl sulfoxide in experimental middle cerebral artery embolectomy. Neurosurg, n. 49, p. 508-516, 1978.

LESSA, I. Epidemiologia das doenças cerebrovasculares no Brasil. Rev Soc Card Estado de São Paulo, n. 4, p. 509-518, 1999.

LEVINE, S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. The American Journal of Pathology, ano 1, n. 36, p. 1-17, 1960.

LEVINE, S.; PAYAN, H. Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil (*Meriones unguiculatus*). Experimental Neurology, n. 16, p. 255-262, 1966.

LEVINE, S.; SHON, D. Cerebral isquemia in infant and adult gerbils. Arch Path, n. 87, p. 315-317, 1969.

LITTLE, J.R.; COOK, A.; LESSER, R.P. Treatment of acute focal cerebral ischemia with dimethyl sulfoxide. Neurosurgery, ano 1, n. 9, p. 34-9, 1981.

LITTLE, J.R.; SPETZLER, R.F.; ROSKI, R.A.; SELMAN, W.R.; ZABRAMSKI, J.; LESSER, R.P. Ineffectiveness of DMSO in treating experimental brain ischemia. Ann N Y Acad Sci, n. 411, p. 269-77, 1983.

LITTLE, J.R.; KERR, W.L.; SUNDT, T.M. The role of lysosomes in the production os ischemic nerve cell changes. *Arch Neurol*, n. 30, p. 448-455, 1974.

LOCKETTE, K.F., KEYES, M. Conditioning with physical disabilities. Chicago: Rehabilitation Institute of Chicago, 1994.

LOTUFO, P.A. Mortalidade pela doença cerebrovascular no Brasil. *Rev Brasileira de Hipertensão*, ano 4, n. 7, p. 387-391, 2000.

MACHADO, G. F. Mapeamento de astrócitos imunoreativos a proteína glial fibular ácida (GFAP) em SNC de bovinos normais e naturalmente infectados pelo vírus da raiva. 125p. 1994 (FCAV). Unesp. Jaboticabal. Dissertação de mestrado.

MENDEZ, A. Lupus Eritromatoso Sistêmico. *Revista Bioquímica Médica e Ortomolecular*, ano 3, n. 12, p. 30-31, 2003.

McCAMMON, K.A.; LENTZNER, N.A.; MORIARTY, R.P.; SCHELLHAMMER, P.F. Intravesical dimethyl sulfoxide for primary amyloidosis of the bladder. *Urology*, n. 52, p. 1136-8, 1998.

McGRAW, C.P. Treatment of cerebral infarction with dimethyl sulfoxide in the mongolian gerbil. *Annals New York Academy of Sciences*, n. 411, p. 278-85, 1983.

MENZIES, S.A.; HOFF, J.T.; BETZ, A.L. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*, n. 31, p. 100-107, 1992.

MICHEL, M.C. Concomitant regulation of Ca²⁺ mobilization and Gi3 expression in human erythroleukemia cells. *Eur J Pharmacol*, n. 348, p. 135-41, 1998.

MILESON, B.E.; SCHWARTZ, R.D. The use of locomotor activity as a behavioral screen for neuronal damage following transient forebrain ischemia in gerbils. *Neuroscience Letters*, n. 128, p. 71-76, 1991.

MORASSI, P.; MASSA, F.; MESESNEL, E.; MAGRIS, D.; D'AGNOLO, B. Treatment of amyloidosis with dimethyl sulfoxide (DMSO). *Minerva Med*, n. 80, p. 65-70, 1989.

MURAV'EV, I.V. Treatment of rheumatoid synovitis by intra-articular administration of dimethyl sulfoxide and corticosteroid. *Ter Arkh*, n. 58, p. 104-5, 1986.

MURTHER, R.S.; BENNET, N.M. Effects of dimethyl sulfoxide on renal function in man. *J Am Med Assoc*, n. 244, p. 2081-2083, 1980.

OGURA, T.; SHUBA, L.M.; MCDONALD, T.F. Action potentials, ionic currents and cell water in guinea pig ventricular preparations exposed to dimethyl sulfoxide. *J Pharmacol Exp Ther*, n. 273, p. 1273-86, 1995.

PARKIN, J. SHEA, C. SANT, G.R. Intravesical dimethyl sulfoxide (DMSO) for interstitial cystitis: a practical approach. *Urology*, n. 49, p. 105-7, 1997.

PHILLIS, J.W.; ESTEVEZ, A.Y.; O'REGAN, M.H. Protective effects of the free radical scavengers, dimethyl sulfoxide and ethanol, in cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Lett*, ano 2, n. 244, p. 109-11, 1998.

POUCET, B. Object exploration, habituation, and response to a spatial change in rats following septal or medial frontal cortical damage. *Behav Neurosc.*, n. 5, v. 103, p. 1009-1016, 1989.

PULSINELLI, W.A.; BRIERLEY, J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, n. 10, p. 267-272, 1979.

REGELSON, W.; HARKINS, S.W. "Amyloid is not a tombstone"—a summation. The primary role for cerebrovascular and CSF dynamics as factors in Alzheimer's disease (AD): DMSO, fluorocarbon oxygen carriers, thyroid hormonal, and other suggested therapeutic measures. *Ann NY Acad Sci*, n. 826, p. 348–74, 1997.

ROSENSTEIN, E.D. Topical agents in the treatment of rheumatic disorders. *Rheum Dis Clin North Am*, n. 25, p. 899–918, 1999.

ROSENBLUM, W.I.; EL-SABBAN, F. Dimethyl sulfoxide and glycerol, hydroxyl radical scavengers, impair platelet aggregation within and eliminate the accompanying vasodilation of, injured mouse pial arterioles. *Stroke*, n. 13, p. 35-39, 1982.

RUBIN, L.F. Toxicolog update of dimethyl sulfoxide. *Annals New York Academy of Sciences*, n. 411, p. 6-10, 1983.

SAKURAGAWA, N. Medicinal therapy for lysosomal storage diseases. *Nippon Rinsho*, n. 53, p. 3072–6, 1995.

SALIM, A.S. Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: a new approach. *J Lab Clin Med*, n. 119, p. 710–17, 1992.

SALIM, A.S. Role of oxygen-derived free radical scavengers in the treatment of recurrent pain produced by chronic pancreatitis. A new approach. *Arch Surg*, n. 126, p. 1109–14, 1991.

SANTOS, N.C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; SALDANHA, C.; MARTINS-SILVA, J. Biochemical, biophysical and haemorheological effects of dimethyl sulphoxide on human erythrocyte calcium loading. *Cell Calcium*, n. 31, p. 183–8, 2003.

SANTOS, N.C.; PRIETO, M.J.E.; MORNA-GOMES, A.; BETBEDER, D.; CASTANHO, M.A.R.B. Structural characterization (shape and dimensions) and stability of polysaccharide/lipid nanoparticles. *Biopolymers*, n. 41, p.511–20, 1997.

SCHMITT, U.; HEIEMKE, C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v.59, p.809-811, 1998.

SHIMIZU, S.; SIMON, R.P.; GRAHAM, S.H. Dimethylsulfoxide (DMSO) treatment reduces infarction volume after permanent focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett*, ano 2, n. 239, p. 125-7, 1997.

SHIRAIKI, K.; SIMON, R.P. Amodel of proximal middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of Neuroscience Methods*, n. 30, p. 169-174, 1989.

SHIRLEY, S.W.; STEWARD, B.H.; MIRELMAN, S. Dimethyl sulfoxide in treatment of inflammatory genitourinary disorders. *Urology*, n. 11, p. 215–20, 1978.

SMITH, R.S. A comprehensive macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia. *Med Hypotheses*, n. 39, p. 248–57, 1992.

SPRUIJT, B.M.; HOOFF, J.A.R.A.M.; GISPEN, W.H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological Reviews*, ano 3, n. 72, p. 825-850, 1992.

STEHNO-BITTEL, L.; LUCKHOFF, A.; CLAPMAN, D.E. Clcium release from the nucleos by InsP₃ receptor channels. *Neuron*, n. 14, p. 347-354, 1995.

STEIN, C.; BUENO, O.F.A.; XAVIER, G.F. Rats do react to stimulus omission. *Braz. J Med Biol Res*, n. 27, p. 2423-2430, 1994.

STOKES, M. Acidente Vascular Cerebral. In: *Neurologia para fisioterapeutas*. São Paulo: Editora Premier, 2000. cap. 7, p. 83-100.

STOUT, L.; GERSPACH, J.M.; LEVY, S.M.; YUN, S.K.; LAD, P.M.; LEACH, G.E.; ZIMMERN, P.E. Dimethyl sulfoxide does not trigger urine histaminerelease in interstitial cystitis. *Urology*, n. 46, p. 653–6, 1995.

SUGITA, Y.; KONDO, T.; KANAZAWA, A.; ITOU, T.; MIZUNO, Y. Protective effect of FPF 1070 (cerebrolysin) on delayed neuronal death in the gerbil-detection of hidroxyl readicals with salicylic acid. *Brain Nerve*, n. 45, p. 325-331, 1993.

SWANSON, B.N. Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO). *Rev Clin Basic Pharm*, n. 5, p. 1–33, 1985.

UMPHRED, D.A. Hemiplegia resultante de agressão ou doença vascular. In: *Fisioterapia Neurológica*. São Paulo: Editora Manole LTDA, 2004. cap. 22, p. 615-656.

WAHL, F.; ALLIX, M.; PLOTKINE, M.; BOULU, R.G. Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, ano 2, n. 23, p. 267-272, 1992.

WANG, D.; CORBETT, D. Cerebral ischemia, locomotor activity and spatial mapping. *Brain Res*, n. 533, p. 78-82, 1990.

WEINSTEIN, P.R.; HAMEROFF, S.R.; JOHNSON, P.C.; ANDERSON, G.G. Effect of hyperbaric oxygen therapy or dimethyl sulfoxide on cerebral ischemia in unanesthetized gerbils. *Neurosurgery*, ano 5, n. 18, p. 528-32, 1986.

WOOD, D.C.; WOOD, J. Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. Ann N Y Acad Sci, n. 27 , p. 7-19, 1975.

YANAGIHARA, T. Experimental stroke in gerbils: correlation of clinical, pathological and electroencephalographic findings and protein synthesis. Stroke, n. 9, p. 155-159, 1978.

YELLOWS, P.C.; GREENFIELD, D.; McINTYRE, N. Dimethylsulphoxide induced toxicity. Lancet, ano 2, n. 8202, p. 1044-1046, 1980.

YOSHIDA, S.; ABE, K.; BUSTO, R.; WATSON, B.D.; KOGURE, K.; GISBERG, M.D. Influence of transient ischemia in lipidosoluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain. Brain Resch, n. 245, p. 307-316, 1982.

YOUNG, B.; HEATH, J.W. Histologia funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ZHANG, X.Q.; EYZAGUIRRE, C. Effects of hypoxia induced by Na₂S₂O₄ on intracellular calcium and resting potential of mouse glomus cells. Brain Res, n. 818, p. 118-26, 1999.

APÊNDICE

Tabela 1- Número total de cruzamentos, durante os quatro dias de avaliação, realizados pelos animais do grupo controle (grupo I).

CONTROLE	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
animal 1	525	463	511	589
animal 2	425	533	495	390
animal 3	665	641	595	572
animal 4	463	401	439	442
animal 5	457	350	319	374
animal 6	479	337	298	368
MÉDIA	502,33	454,17	442,83	455,83
DPM	86,14	117,14	115,63	100,16
EPM	35,00	48,00	47,00	41,00

Tabela 2- Número total de cruzamentos, durante os quatro dias de avaliação, realizados pelos animais do grupo falso-operado (grupo II).

SHAM	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
animal 1	442	255	481	372
animal 2	378	397	293	466
animal 3	357	233	286	379
animal 4	384	357	252	358
animal 5	385	513	677	396
animal 6	365	365	725	630
MÉDIA	385,17	353,33	452,33	433,50
DPM	29,94	101,69	209,20	103,47
EPM	12,00	42,00	85,00	42,00

Tabela 3- Número total de cruzamentos, durante os quatro dias de avaliação, realizados pelos animais do grupo isquemia não tratado (grupo III).

ISQUEMIA	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
animal 1	25	442	185	222
animal 2	130	102	87	98
animal 3	244	199	170	330
animal 4	238	215	263	293
animal 5	86	104	134	196
animal 6	218	327	244	346
MÉDIA	156,83	231,50	180,50	247,50
DPM	90,60	132,50	66,14	94,05
EPM	37,00	54,00	27,00	38,00

Tabela 4- Número total de cruzamentos, durante os quatro dias de avaliação, realizados pelos animais do grupo DMSO I: Roedores que receberam 215mg/kg de DMSO (grupo IV).

DMSO I	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
animal 1	142	288	390	474
animal 2	141	440	444	466
animal 3	415	690	624	608
animal 4	390	645	540	635
animal 5	675	675	612	620
animal 6	358	339	421	453
MÉDIA	353,50	512,83	505,17	542,67
DPM	199,19	179,57	100,83	86,50
EPM	81,00	73,00	41,00	35,00

Tabela 5- Número total de cruzamentos, durante os quatro dias de avaliação, realizados pelos animais do grupo DMSO II: Roedores que receberam 645mg/kg de DMSO (grupo V).

DMSO II	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
animal 1	272	348	354	552
animal 2	253	492	561	834
animal 3	231	720	465	930
animal 4	360	420	420	640
animal 5	450	510	660	660
animal 6	666	410	540	624
MÉDIA	372,00	483,33	500,00	706,67
DPM	165,35	130,00	109,42	143,85
EPM	68,00	53,00	45,00	59,00

Tabela 6- Número total de levantamentos, durante os quatro dias de avaliação, realizados pelos animais do grupo controle (grupo I).

CONTROLE	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
animal 1	268	241	249	315
animal 2	182	265	253	205
animal 3	350	309	345	360
animal 4	222	219	315	296
animal 5	341	245	304	395
animal 6	169	231	187	220
MÉDIA	255,33	251,67	275,50	298,50
DPM	77,98	31,99	57,00	75,20
EPM	32,00	13,00	23,00	31,00

Tabela 7- Número total de levantamentos, durante os quatro dias de avaliação, realizados pelos animais do grupo falso-operado (grupo II).

SHAM	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
animal 1	169	119	208	211
animal 2	216	201	142	289
animal 3	161	115	187	259
animal 4	193	176	166	162
animal 5	209	273	459	201
animal 6	202	230	492	448
MÉDIA	191,67	185,67	275,67	261,67
DPM	22,16	62,22	156,68	101,64
EPM	9,00	25,00	64,00	41,00

Tabela 8- Número total de levantamentos, durante os quatro dias de avaliação, realizados pelos animais do grupo isquemia não tratado (grupo III).

ISQUEMIA	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
animal 1	0	79	30	87
animal 2	37	33	29	44
animal 3	91	78	51	168
animal 4	85	108	112	122
animal 5	17	25	52	67
animal 6	75	112	134	134
MÉDIA	50,83	72,50	68,00	103,67
DPM	38,17	36,63	44,28	45,99
EPM	16,00	15,00	18,00	19,00

Tabela 9- Número total de levantamentos, durante os quatro dias de avaliação, realizados pelos animais do grupo DMSO I: Roedores que receberam 215mg/kg de DMSO (grupo IV).

DMSO I	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
animal 1	72	164	156	270
animal 2	67	282	234	221
animal 3	135	255	180	306
animal 4	75	180	198	390
animal 5	159	210	180	375
animal 6	185	191	228	289
MÉDIA	115,50	213,67	196,00	308,50
DPM	50,97	45,84	30,28	64,17
EPM	21,00	19,00	12,00	26,00

Tabela 10- Número total de levantamentos, durante os quatro dias de avaliação, realizados pelos animais do grupo DMSO II: Roedores que receberam 645mg/kg de DMSO (grupo V).

DMSO II	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia
animal 1	68	166	160	234
animal 2	78	194	333	432
animal 3	120	342	135	485
animal 4	219	360	310	371
animal 5	165	243	294	375
animal 6	210	250	408	420
MÉDIA	143,33	259,17	273,33	386,17
DPM	65,00	77,85	105,31	85,47
EPM	27,00	32,00	43,00	35,00

Tabela 11- Porcentagem de células isquêmicas no hipocampo apresentada pelos animais dos grupos isquemia não tratado, DMSO I e DMSO II.

ISQUEMIA	DMSO I	DMSO II
animal 1	100	20
animal 2	38	40
animal 3	100	37
animal 4	62	72
animal 5	57	100
animal 6	70	59
MÉDIA	71,17	54,67
DPM	24,69	28,65
EPM	10,08	11,70

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE FRANCA

Pró-Reitoria Adjunta de Pesquisa e de Pós-Graduação

**CEP - Comitê de
Ética
em Pesquisa**

DECLARAÇÃO

Declaro que o trabalho intitulado “**AÇÕES NEUROPROTETORAS DO DMSO SOBRE A ISQUEMIA ENCEFÁLICA EM GERBILS**”, Protocolado sob o nº 019/05, de autoria de **POLIANA PENASSO**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos de Pesquisa em Animais** adotado pela **Comissão de Ética em Pesquisa (CEP)** da Universidade de Franca - SP, foi aprovado em reunião realizada em 12.04.04.

Franca, 12 de abril de 2004.



Prof. Dr. Dionísio Vinha
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa e
Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa e de Pós-Graduação