

**INFLUÊNCIA DE ELETROCONVULSÕES SOBRE A PERMEABILIDADE
DA BARREIRA SANGUE-CÉREBRO AO AZUL TRIPAN**

JADERSON COSTA DA COSTA *

A passagem de substâncias ao cérebro é lenta, comparada com outros tecido, sendo admitida a existência de duas "barreiras" — a barreira sangue-cérebro (BSC) e a barreira sangue-líquor (BSL) — ambas com as mesmas características¹².

Um dos métodos empregados para o estudo destas características consiste na injeção intravenosa de azul tripan^{5, 6, 10, 16}. Este corante, quando injetado numa veia periférica tingem todos os órgãos e apenas algumas regiões do sistema nervoso central (lobo posterior da hipófise²¹, área postrema no assoalho do quarto ventrículo²⁷, corpo pineal¹⁵, tubérculo intercolunar¹⁷, parede do recesso óptico³ e eminência sacular do pedúnculo da hipófise²⁸). As demais regiões do SNC não são atingidas. Nestas condições experimentais não ocorrem sintomas de intoxicação. Entretanto, se o corante for injetado diretamente no espaço subaracnóide, mesmo em baixa concentração, ocorrem convulsões e o animal morre dentro de pouco tempo. Neste caso o SNC mostra-se atingido pelo corante¹⁰.

Por outro lado, numerosas investigações têm sido feitas tentando explicar os efeitos benéficos da terapia por eletrochoque em certas condições psiquiátricas, especialmente em estados depressivos^{1, 11}. Aird e col.¹ sugeriram que os efeitos terapêuticos obtidos por eletrochoques fossem decorrentes do aumento da permeabilidade da BSC, e Rozdilski e Olszewski²⁰ demonstraram que eletrochoques repetidos aumentam a permeabilidade dos vasos sanguíneos cerebrais a moléculas protéicas. Angel e col.² também verificaram

Departamento de Fisiologia, Farmacologia e Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: * Bolsista do Conselho de Pesquisas da UFRGS.

Nota do autor — Agradecemos à Dra. Maria Marques pela orientação, crítica e estímulo à realização deste trabalho; ao Conselho de Pesquisas pela confiança depositada; à Maria Cláudia C. Irigoyen pelas preparações histológicas; ao Prof. Celso P. Jaeger pelos conselhos e por ter possibilitado a realização do estudo microscópico; ao Sr. Cláudio A. Juchem pela ajuda na confecção das lâminas; à Sra. Suely Vieira pela ajuda na montagem da técnica de eletroconvulsões; ao Prof. Paolo Contu e ao bolsista Nilton Bradão pela orientação na técnica histológica; e às funcionárias do Serviço de Bibliografia e Documentação da UFRGS.

o mesmo em relação à permeabilidade da BSC à cocaína. Lee e Olszewski¹⁴ postularam que o aumento da permeabilidade da BSC está relacionado com o aumento da atividade neuronal durante os eletrochoques.

O presente trabalho relata as modificações na permeabilidade da BSC ao azul tripan em ratos submetidos a convulsões induzidas por estímulos elétricos e o tempo de duração deste efeito.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 67 ratos fêmeas, oriundos do biotério do Departamento de Fisiologia, Farmacologia e Biofísica, pesando em média 100 g. Os animais foram divididos em cinco grupos: 18 ratos (testemunhas) somente receberam a injeção de azul tripan e foram subdivididos em 3 subgrupos de 6, de acordo com o intervalo de tempo entre a injeção do corante e a anestesia do animal (1, 2 ou 3 horas); 18 ratos foram submetidos à 12 eletrochoques no período de 30 dias (3 eletrochoques/semana) e injetados com azul tripan ao término da última eletroconvulsão, sendo 6 animais anestesiados 1 hora após a injeção do corante, 6 após 2 horas e 6 após 3 horas; 18 ratos foram submetidos à 12 eletrochoques durante 24 horas, e logo após injetados com azul tripan, sendo divididos em 3 subgrupos de 6 animais, anestesiados após intervalos de 1, 2 e 3 horas; 5 ratos foram tratados com 12 eletrochoques, durante 3 horas, e, logo depois, injetados com azul tripan, sendo a anestesia destes animais feita 3 horas após a injeção do corante; 8 ratos foram previamente injetados com azul tripan e logo após receberam 12 eletrochoques sucessivos no período de 3 horas, sendo anestesiados ao término da última convulsão.

O azul tripan foi injetado em solução aquosa (1 g%) intraperitonealmente e na dose de 1 ml/100 g de peso corporal. Decorrido o tempo pré-estabelecido de 1, 2, ou 3 horas os animais eram anestesiados com éter, perfundidos com solução salina e fixados *in vivo* com formalina a 10%.

Foi empregado o método de eletrochoque introduzido por Merritt e Putnam para gatos¹⁶, e modificado por Drill para roedores (camundongos, ratos e coelhos)¹⁷. Foram utilizados eletrodos corneais de Spiegel²² e corrente alternada de 130 V, 50 Hz, provenientes de um estimulador (Harvard Apparatus Stimulator, mod. n.º 340). Os estímulos eram aplicados durante 5 segundos.

Para fixação do encéfalo *in vivo* seguiu-se a técnica utilizada por Contu em cão¹, e por nós modificada para ratos. Anestesia-se o animal com éter, individualiza-se a veia jugular e a aorta abdominal, ligando-a o mais distalmente possível. Canula-se esta artéria e injeta-se solução salina; a jugular é então seccionada para deixar sair o líquido injetado e o sangue contido no espaço vascular. Quando a solução salina começa a sair livre de sangue, injeta-se formalina a 10% num total de 40 ml. Depois retira-se o encéfalo e coloca-se em recipiente com formalina a 10%. O tempo decorrido entre a anestesia do animal e o término da fixação *in vivo* do encéfalo foi de 10 minutos, aproximadamente.

Para a microscopia foram feitos cortes por congelação de espessura variável de 20-30 micra, examinados sob microscopia óptica¹⁹.

R E S U L T A D O S

A análise macro e microscópica dos encéfalos demonstrou que, no primeiro grupo, constituído por animais que receberam azul tripan, as únicas estruturas intracranianas coradas foram a epífise e as meninges. A intensidade de coloração da epífise era tanto maior quanto maior fosse a permanência do corante no espaço vascular: uma, duas ou três horas (Tabela 1).

No 2.º e 3.º grupos, constituídos por animais tratados com eletrochoques de forma crônica (12 eletroconvulsões/30 dias) ou aguda (12 eletroconvulsões/24 horas), respectivamente, observou-se o mesmo que no 1.º grupo, ou seja, não se visualizou

variação na permeabilidade da BSC ao azul tripan: as meninges e a epífise foram as únicas estruturas que se mostraram tingidas. Nestes grupos também se verificou maior intensidade de coloração da epífise, conforme o tempo decorrido entre a injeção do corante e a anestesia do animal (Tabela 1).

No 4.º grupo, constituído de animais com 12 eletroconvulsões/3 horas, a intensidade de coloração da epífise também foi proporcional ao tempo de permanência do corante no espaço vascular. Um dos animais deste grupo morreu durante o experimento em apnéia. Observou-se o tingimento dos hemisférios cerebrais de outro animal.

No último grupo (administração prévia do azul tripan e, posteriormente, 12 eletroconvulsões/3 horas) todos os animais apresentam meninges e epífise coradas, cinco tiveram seus hemisférios cerebrais tingidos, dois os bulbos olfatórios e, um, o cerebelo (Tabela 2). Dois animais deste grupo morreram em apnéia durante as eletroconvulsões.

Grupos	Eletrochoques	Permanência do corante (horas)	N.º de ratos	Intensidade de coloração			
				0	+	++	+++
I	—	1	6	1*	5		
		2	6			6	
		3	6				6
II	12/30 dias	1	6		4	1	1
		2	6			4	2
		3	6				6
III	12/24 horas	1	6		5	1	
		2	6			6	
		3	6				6

Tabela 1 — Influência do tempo de permanência do corante sobre a intensidade de coloração da epífise de ratos injetados com azul tripan. * número de ratos que apresentaram epífise corada.

Tratamento	N.º de ratos	Estruturas do SNC coradas			
		meninges epífise	hemisf. cerebral	bulbo olfatório	cerebelo
12 eletrochoques em 3 horas e logo após injeção de azul tripan	5*	4	1	0	0
Prévia injeção de azul tripan e logo após 12 eletrochoques/3 horas	8**	6	5	2	1

Tabela 2 — Influência do eletrochoque sobre as observações macro e microscópicas de estruturas do sistema nervoso central (SNC) de ratos tratados pelo azul tripan. * Morreu um rato durante o experimento. ** Dois ratos morreram durante o expe-

COMENTÁRIOS

No primeiro grupo de animais não se observou tingimento do encéfalo pelo azul tripan, porque o azul tripan é um corante ácido e está estabelecido que os corantes ácidos não penetram pela BSC, embora possam penetrar pela BSL, quando em altas concentrações no sangue. Os corantes básicos (azul de metileno) facilmente penetram na BSC, mas não tingem o líquido cefalorraqueano^{8, 9}. Esta diferença entre a penetração de corantes ácidos e básicos na BSC indica que as cargas elétricas podem exercer importante papel na permeabilidade desta barreira. Qualquer substância com carga elétrica positiva ou neutra, no pH plasmático, tem sua penetração facilitada pela BSC, enquanto que a uma carga negativa a BSC torna-se impermeável. Entretanto, as cargas elétricas por si só não regulam a passagem pela BSC. A solubilidade em lipídios é outro fator que merece consideração.¹³ Por outro lado, vários autores, utilizando substâncias diversas para verificar a permeabilidade da BSC, constataram aumento na sua permeabilidade quando os animais eram submetidos a eletrochoques repetidos^{1, 2, 18, 20}. Outros estudos também têm mostrado alterações neurofisiológicas e bioquímicas tais como as que ocorrem transitóriamente em convulsões^{1, 23, 24, 25}.

Aird e col.¹ verificaram aumento da permeabilidade da BSC à cocaina, três dias após a última eletroconvulsão. Outros autores, entretanto, não verificaram mudanças prolongadas na permeabilidade da BSC de animais submetidos a eletroconvulsões.

No presente trabalho, não se constatou variação na permeabilidade da BSC, quando os animais foram tratados previamente com 12 eletroconvulsões/30 dias ou 12 eletroconvulsões/24 horas, pois não se verificou tingimento dos encéfalos. Nestes animais, embora não houvesse coloração dos encéfalos, poderia, entretanto, ter ocorrido fugaz variação na permeabilidade da BSC que, devido à sua curta duração, não pudesse ter sido observada.

Assim, numa tentativa de surpreender esta possível variação da permeabilidade da BSC ao azul tripan, injetou-se previamente este corante nos animais, submetendo-os logo após a 12 eletroconvulsões/3 horas. A comparação destes resultados com aqueles obtidos quando primeiro se trataram os animais com 12 eletroconvulsões/3 horas para depois injetar o azul tripan, permite admitir que houve breve mudança na permeabilidade da BSC ao azul tripan, provocada pelo eletrochoque. Rodriguez-Pérez e col.¹⁸ submeteram coelhos, previamente injetados com azul tripan, a eletrochoques repetidos e demonstraram que o eletrochoque era capaz de permeabilizar a BSC; contudo estes autores não determinaram a duração deste efeito.

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que o aumento da permeabilidade da BSC ao azul tripan, em ratos submetidos a eletroconvulsões, ocorre em intervalo de tempo muito curto, pois que este corante administrado logo após ao último eletrochoque, já não consegue atravessar a BSC; isto pode ser justificado levando-se em conta o alto poder injuriante do azul tripan¹⁰, pois que para outras substâncias, como a cocaina, a alteração da permeabilidade permanece por mais tempo².

Quando existem lesões orgânicas, como nas meningites, arteriosclerose cerebral e tumores cerebrais²⁶, a permeabilidade da BSC encontra-se persistentemente aumentada. Nêstes casos fica alterado o substrato anatómico da BSC que inclui um sinergismo funcional entre vários elementos teciduais.

Poder-se-ia pensar que o aumento da permeabilidade da BSC produzido pelo eletrochoque fôsse devido à lesão direita do cérebro pela corrente elétrica; entretanto estudos de Lee e Olszewiski¹⁴ afastaram esta possibilidade. Não se verificaram também encéfalos hemorrágicos em ratos tratados com 12 eletroconvulsões/3 horas, o que seria indicativo de lesão vascular.

Conclui-se que, nas nossas condições experimentais, o aumento da permeabilidade da BSC ao azul tripan em ratos submetidos a eletroconvulsões, ocorre durante um tempo muito curto devido, provavelmente, aos mecanismos de manutenção da homeostase do meio interno.

R E S U M O

Foi estudada a influência de eletroconvulsões sôbre a permeabilidade da BSC ao azul tripan, em ratos. Para a indução de eletroconvulsões foram usados eletródios corneais de Spiegel e um estimulador. A avaliação da permeabilidade da BSC foi feita mediante exame macro e microscópico do encéfalo de animais injetados com azul tripan, corante que normalmente não tingi o SNC. Foi verificado que as únicas estruturas intracranianas coradas, tanto nos animais submetidos a eletroconvulsões antes da injeção do corante, como nos testemunhas que não receberam eletrochoques, foram as meninges e a epífise. A intensidade de coloração da epífise dependia do tempo de permanência do corante no espaço vascular. Entretanto, quando o corante foi injetado antes de submeter os animais a eletroconvulsões, ocorreu tingimento do SNC, pelo azul tripan. Sugere-se a existência de um mecanismo homeostático para manter a integridade do meio interno do neurônio.

S U M M A R Y

Influence of electroconvulsions on the permeability of the blood-brain barrier to trypan blue

The effect of electrically induced convulsions upon the permeability of the blood-brain barrier to trypan blue was studied in 67 rats. A sequence of 12 electroshocks over a period of 30 days, 24 hours or 3 hours were produced with the Spiegel's corneal electrodes and a stimulator. The permeability study of the blood-brain barrier was performed through the gross and microscopic anatomical examinations of the central nervous system of animals injected with trypan blue, supravital dye, which normally does not get through the blood-brain barrier and thus does not stain the brain.

It was verified that only the pineal body and the meninges have been stained in both treated and non-treated electrochocked groups. The stain

intensity of the pineal body was proportional to the duration of the dye in the vascular space (one, two or three hours). Nevertheless staining of the central nervous system was observed when the dye was injected before the animals had been subjected to 12 electroshocks/3 hours.

The results of the present study suggest that the increase in permeability of the blood-brain barrier to trypan blue, in rats treated with repeated electrically induced convulsions, persists only for short periods of time. It is possible that the increased permeability is related to increased neuronal activity during electroshocks.

R E F E R E N C I A S

1. AIRD, R. B.; STRAIT, L. A.; PACE, J. W.; HRENOFF, M. K. & BOWDITCH, S. C. — Neurophysiologic effects of electrically induced convulsions. *Arch. Neurol. Psychiat.* (Chicago) 75:371, 1956.
2. ANGEL, C.; HARTMAN, A. M.; BURKETT, M. L. & ROBERTS, A. J. — Effects of electroshock and trypan red on the blood-brain barrier and response retention in the rat. *J. Nerv. Ment. Dis.* 140:405, 1965.
3. BEHNSEN, G. — Über die Farbstoffspeicherung im Zentral — nervensystem der weissen Maus in verschiedenen Alterszuständen. *Zeitsch. f. Zellforsch. u. mikr. Anat.* 4:515, 1927.
4. CONTU, P. — Observações experimentais sobre os espaços perivasculares no cão (nota prévia). *Arq. Inst. Anat.* 6:5, 1963-1964.
5. DAVSON, H. — Intracranial and intraocular fluids. *In Handbook of Physiology*, sect. I, Neurophysiology, vol. 3. Williams and Wilkins, Baltimore, 1960.
6. DOBBING, J. — The blood-brain barrier. *Physiol. Rev.* 41:130, 1961.
7. DRILL, V. A. — *Pharmacology in Medicine*. Mcgraw-Hill Book Co., New York-Toronto-London, 1958.
8. FLEXNER, L. B. — Some problems of the origin, circulation and absorption of the cerebrospinal fluid. *Quart. Rev. Biol.* 8:397, 1933.
9. FRIEDEMANN, U. — Blood-brain barrier. *Physiol. Rev.* 22:125, 1942.
10. GOLDMANN, E. E. — Die äussere und innere sekretion des gesunden und kranken Organismus im lichte der "vitalen Färbung". *Beitr. Klin. Chir.* 64: 192, 1909.
11. GORDON, H. L. — Fifty shock therapy theories. *Mil. Surgeon* 103:397, 1948.
12. HERLIN, L. — On phosphate exchange in the central nervous system with special reference to metabolic activity in barriers. *Acta Physiol. Scand.*, Suppl. 127, nr. 37, 1956.
13. KROGH, A. — The active and passive exchanges of inorganic ions through the surfaces of living cells and through living membranes generally. *Proc. Roy. Soc. London* 133:140, 1946.
14. LEE, J. C. & OLSZEWSKI, J. — Increased cerebrovascular permeability after repeated electroshocks. *Neurology (Minneapolis)* 11:515, 1961.
15. MACKLIN, C. C. & MACKLIN, M. T. — A study of brain repair in the rat by the use of trypan blue. *Arch. Neurol. Psychiat.* 3:353, 1920.
16. MERRITT, H. H. & PUTNAM, T. J. — A new series of anticonvulsant drugs tested by experiments on animal. *Arch. Neurol. Psychiat.* 39:1003, 1938.
17. PUTNAM, T. J. — The intercolumnar tubercle: an undescribed area in the anterior wall of the third ventricle. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 33:181, 1922.
18. RODRIGUES-PÉREZ, A. P.; JARAMILLO, G. & GÓMEZ, J. — Permeabilización de la barrera hematoencefalica com electroshock. *Rev. med. Rio Grande do Sul* 8:93, 1951.
19. ROMEIS, B. — *Guia-Formulário de Técnica histológica*. Editorial Labor, Barcelona, 1928.

20. ROZDILLSKY, B. & OLSZEWSKI, J. — Permeability of cerebral blood vessels studied by radioactive iodinated bovine albumin. *Neurology (Minneapolis)* 7: 270, 1957.
21. SCHULEMANN, W. — Beiträge zur Vitalfärbung. *Arch. f. mikr. Anat.* 79:223, 1912.
22. SPIEGEL, E. A. — Quantitative determination of the convulsive reactivity by electrical stimulation of the brain with the skull intact. *J. Lab. Clin. Med.* 22:1274, 1937.
23. SPIEGEL, E. A.; SPIEGEL-ADOLF, M. & HENNY, G. — Physicochemical changes in brain accompanying electrically induced convulsive discharges. *Tr. Amer. Neurol. Ass.* 68:174, 1942.
24. SPIEGEL, E. A. & SPIEGEL-ADOLF, M. — Physicochemical effects of electrically induced convulsions: cerebrospinal fluid studies. *Tr. Amer. Neurol. Ass.* 70:130, 1944.
25. SPIEGEL-ADOLF, M.; SPIEGEL, E. A.; ASHKENAZY, E. W. & LEE, A. J. — Physicochemical effects of electrically induced convulsions: cerebrospinal fluid studies. *J. Neuropath. Exper. Neurol.* 5:277, 1945.
26. WHITE, A.; HANDLER, P. & SMITH, E. — *Principles of Biochemistry*. McGraw-Hill Book Co. Ltd., Tokyo, 1967.
27. WISLOCKI, G. B. & PUTNAM, T. J. — Note on the anatomy of the areae postremae. *Anat. Rec.* 19:281, 1920.
28. WISLOCKI, G. B. & KING, L. S. — The permeability of the hypophysis and hypothalamus to vital dyes, with a study of the hypophyseal vascular supply. *Amer. J. Anat.* 58:421, 1936.

Departamento de Fisiologia, Farmacologia e Biofísica — Instituto de Biociências — Universidade Federal do Rio Grande do Sul — 90000 Pôrto Alegre, RS — Brasil