

# EFEITOS DE SOLUÇÃO HIPERTONICA POR VIA ENDOVENOSA NOS ESPAÇOS PERIVASCULARES CEREBRAIS DO CÃO

PAOLO CONTU \*

MATILDE ACHAVAL ELENA \*\*

Os mecanismos anátomo-funcionais dos espaços perivasculares do sistema nervoso central (SNC) constituem assuntos muito discutidos. No presente trabalho apresentamos os resultados obtidos no estudo da membrana pio-glial, vaso e espaço perivascular após injeções hipertônicas endovenosas no cão, parcialmente comunicados em nota prévia (Contu, 1964)<sup>5</sup> e que agora serão analisados à luz de recentes conhecimentos sobre o assunto.

Em toda superfície do SNC o dispositivo vascular se ramifica em ramos arteriais e venosos de até 100 micra de diâmetro, que penetram no interior do parênquima nervoso, diminuindo de calibre e separados do mesmo parênquima pelos espaços perivasculares de Virchow-Robin. Estes espaços segundo as observações de Virchow<sup>19</sup>, Robin<sup>16</sup>, His<sup>9</sup>, Weed<sup>20</sup>, Schaltenbrand & Bailey<sup>17</sup>, Gadrat<sup>6</sup>, Patek<sup>14</sup>, Kuhlembeck<sup>10</sup>, Bairati<sup>2</sup>, Glees<sup>8</sup>, Woollam & Millen<sup>22</sup>, Bairati<sup>3</sup>, Tschirg<sup>18</sup>, entre outros, são atualmente bem conhecidos como continuação do espaço subaracnóide. A nível capilar a neuroglia substitui a pia-aracnóide, desaparecendo assim o espaço perivascular e observando-se íntimo contato dos pés sugadores com a parede capilar mesma, base morfológica da barreira sangue-cérebro.

## MATERIAL E METODOS

Utilizamos a área do espaço paraolfatório basal (correspondente à substância perforada anterior humana) de 16 cães de raças diferentes discriminados na tabela 1, pelo número, sexo, peso e idade.

As modalidades técnicas foram as seguintes:

Nos cães C1-C24, em anestesia total nembutálica (33mg por Kg de peso) foram injetados na veia femoral 20cc de uma solução hipertônica de cloreto de sódio (20 por mil) muito lentamente, levando de 6 a 10 minutos. Contemporaneamente na região temporal esquerda, cortando com incisão longitudinal a pele, o músculo temporal e o perióstio, foi praticada a trepanação de uma área óssea de 2-3cm de diâmetro,

---

Trabalho realizado no Laboratório de Neuroanatomia do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Biociências da UFRGS, com auxílio do C.N.Pq. e da UFRGS: \* Chefe do Laboratório de Neuroanatomia e Pesquisador IA do C.N.Pq; \*\* Professor visitante do Curso de Pós-graduação em Neuroanatomia.

	CÃO Nº	SEXO	PESO	IDADE
CASOS EXPERIMENTAIS	C1	♂	13 Kg	adulto
	C7	♂	21 Kg	adulto
	C8	♂	13 Kg	adulto
	C10	♀	17 Kg	adulto
	C11	♂	19 Kg	adulto
	C12	♀	15 Kg	adulto
	C15	♀	9 Kg	adulto
	C20	♂	9,5 Kg	adulto
	C23	♂	11 Kg	adulto
	C24	♂	13 Kg	adulto
CASOS CONTROLES	C25	♀	9 Kg	jovem
	C26	♂	18 Kg	adulto
	C27	♀	9,5 Kg	adulto
	C28	♂	8,5 Kg	adulto
	C29	♀	8 Kg	jovem
	C30	♂	9 Kg	jovem

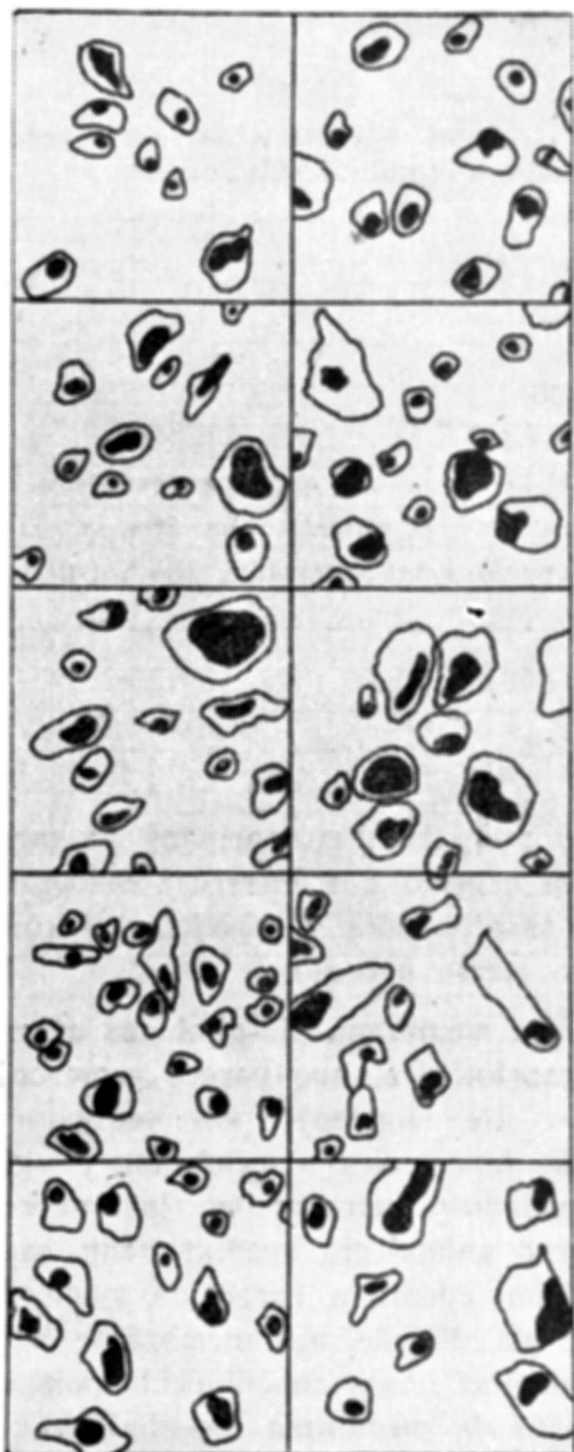
Tabela 1 — Relação dos casos experimentais e casos controles discriminados por código, sexo, peso e idade.

introduzindo, após incisão da dura-mater, no espaço subaracnoidal de um sulco cerebral, um pequeno tubo de polietileno ligado a uma seringa com 20cc de uma solução a 1% de tinta da Índia, injetada lentamente durante 6-8 minutos; 20 minutos após, procedia-se à fixação em vivo do animal com uma solução de formol a 10%. Os cães C23-C30 usados como controle, foram só fixados em vivo, em anestesia nembutálica.

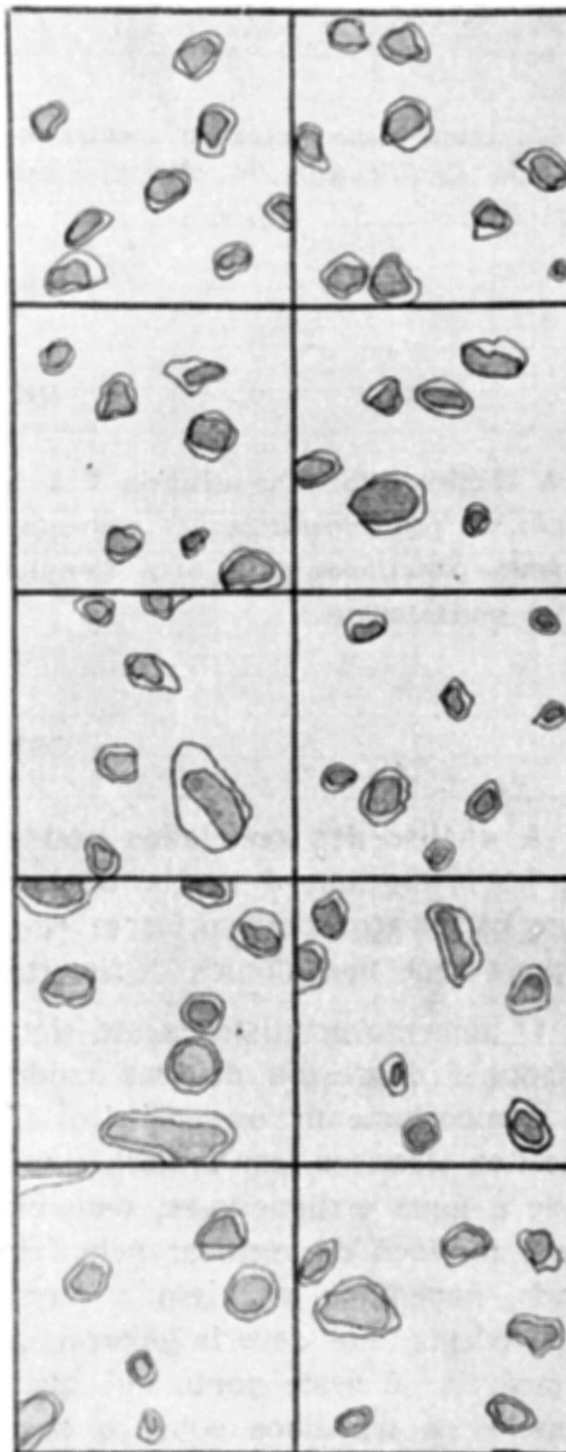
Procedia-se, em seguida, à extração do encéfalo que foi colocado em bandeja com a base para cima e, após a abertura do covo subaracnoidal, foi delimitado com corte em profundidade até a área estriada o espaço paraolfatório que era retirado e fixado em formol a 10% e líquido de Rio-Hortega e incluído em parafina.

Para cada caso foram cortados grupos de secções seriadas de espessura de 20 micra, indo da superfície até 10mm de profundidade, corados com o método de Mallory.

Com a câmara lúcida eram executados desenhos com o aumento de 700 diâmetros, limitados a uma superfície quadrada de 7cm de lado, desenhando-se nesta área os vasos e a membrana pio-glial: para cada caso foram executados 10 desenhos, correspondentes cada a 1mm sucessivo de profundidade (Figs. 1 e 2).



*Fig. 1 - Caso 24, experimental: fotografia dos 10 desenhos feitos com a câmara lúcida. É evidente o aumento dos espaços perivascularres por retração da membrana pio-glial.*



*Fig. 2 - Caso 26, controle: fotografia dos 10 desenhos feitos com a câmara lúcida. Comparando com a fig anterior é bem visível como aparecem os espaços perivascularres normalmente.*

Cada desenho era depois estudado separadamente calculando em mm com o planímetro a área dos vasos e a área da membrana pio-glial, cuja diferença dá a área dos espaços perivasculares. Na tabela 2 e no histograma 1 estão representados os dados obtidos neste trabalho. Para o cálculo do erro-padrão da média (e) foi empregada a seguinte fórmula:

$$s = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}$$

Na comparação entre as médias de grupos tratados e controle foi empregado o teste de significância de Student-Fischer mediante o seguinte cálculo:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{e \cdot 0}$$

## RESULTADOS

A análise estatística (Tabela 2 e histograma 1) revela no grupo experimental em relação ao grupo controle: a) aumento estatisticamente significativo na área pio-glial; b) pouca significância na área vascular; c) aumento estatisticamente significativo do espaço perivascular.

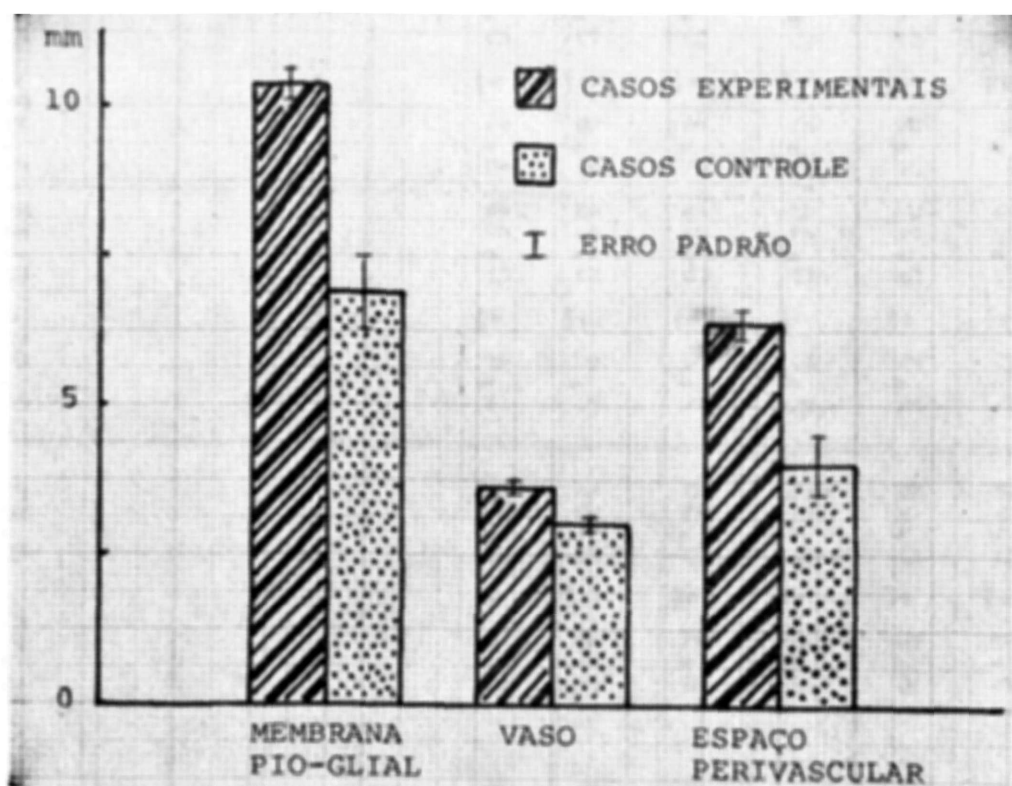
## COMENTARIOS

A análise dos resultados obtidos e que estão bem evidenciados na tabela 2 e no histograma 1 revela de imediato um aspecto que merece consideração sobre os espaços perivasculares em relação às atividades que podem ser consideradas base morfológica de intercâmbio no tecido nervoso.

O aumento estatisticamente significativo na membrana pio-glial dos animais tratados é expressão de uma modificação morfológica, que parece representar um comportamento osmométrico (Gimeno e De Gimeno)<sup>7</sup> pois segundo os conceitos clássicos, em contato com a solução hipertônica a membrana pio-glial perde a água errugando-se, diminuindo de volume e retraindo-se. Isto naturalmente foi fácil de verificar pelo fato de que o animal era imediatamente sacrificado, impedindo por isso a formação de um edema a cargo da membrana glial, edema que deveria ocorrer pelas leis da difusão nas membranas semi-permeáveis: é neste ponto que queremos salientar nossa contribuição, pois são escassos os trabalhos sobre o comportamento da membrana pio-glial, a qual assim poderá ser analisada mais cuidadosamente no conjunto das barreiras no tecido nervoso. Estas barreiras não podem ser esquecidas por causa da predominância da barreira hemato-encefálica que com as características morfológicas descritas no distrito capilar é base para interpretar fisiologicamente a seletividade no intercâmbio (Brierley<sup>4</sup>, Reese & Karnowsky<sup>15</sup>, Weestergaard & Brightman<sup>21</sup>, Oldendorf<sup>12</sup>). Merecem atenção também a barreira meníngea a nível aracnóideo (Nabeshima, Reese, Landis & Brightman)<sup>11</sup>, a barreira hemato-neural a nível do perineuro e capilares endoneurais (Olsson & Reese<sup>13</sup>, Aker<sup>1</sup>).

CASOS EXPERIMENTAIS				CASOS CONTROLES			
CASO Nº	MEMBRANA PÍO-GLIAL	VASO	ESPAÇO PERIVASCULAR	CASO Nº	MEMBRANA PÍO-GLIAL	VASO	ESPAÇO PERIVASCULAR
C 1	10,2 ± 0,55 *	2,8 ± 0,21	6,8 ± 0,38	C25	5,6 ± 0,46	3,0 ± 0,22	2,6 ± 0,32
C 7	10,0 ± 1,09	2,9 ± 0,35	6,2 ± 0,93	C26	6,2 ± 0,40	3,3 ± 0,25	2,9 ± 0,21
C 8	11,1 ± 1,01	3,4 ± 0,42	7,4 ± 0,22	C27	8,6 ± 0,23	3,0 ± 0,18	5,5 ± 0,23
C10	9,1 ± 0,45	3,8 ± 0,30	4,9 ± 0,20	C28	8,3 ± 0,38	3,2 ± 0,21	5,1 ± 0,31
C11	10,0 ± 0,59	4,3 ± 0,30	5,6 ± 0,33	C29	7,4 ± 0,66	2,8 ± 0,28	4,6 ± 0,48
C12	9,8 ± 0,54	3,7 ± 0,28	5,7 ± 0,27	C30	5,6 ± 0,51	2,4 ± 0,21	3,1 ± 0,31
C15	10,7 ± 0,45	3,7 ± 0,15	6,9 ± 0,40				
C20	10,6 ± 0,67	4,2 ± 0,35	6,2 ± 0,40				
C23	11,9 ± 0,34	4,0 ± 0,18	7,6 ± 0,24				
C24	10,5 ± 0,50	3,2 ± 0,21	7,0 ± 0,26				
-	10,39 ± 0,24	3,60 ± 0,16	6,43 ± 0,27	-	6,92 ± 0,63	2,95 ± 0,13	3,97 ± 0,51
t **	6,088	2,778	4,695	* Média Aritimética erro padrão médio			
p ***	0,01	0,02	0,01	** Teste de Student - Fisher			
				*** Probabilidade			

Tabela 2 — Mostra-se nesta tabela a média aritmética obtida na membrana pio-glial, vaso e espaço perivascular nos 10 casos experimentais e nos 6 casos controles.



*Histograma 1 — Evidencia-se o aumento do espaço perivascular, devido ao aumento significativo da membrana pio-glial, o que não acontece no vaso.*

Nossos resultados podem ser resumidos no aumento do espaço perivascular em detrimento da alteração da membrana pio-glial, sem dar importância à área vascular que é estatisticamente insignificante. Consequentemente parece-nos que a membrana pio-glial dos espaços perivasculares não possa ser considerada uma estrutura estática em vista de resposta à solução hipertônica, o que nos leva a considerá-la como parte integrante do complexo neurônio-glia-meninge.

#### RESUMO

Os autores estudam o comportamento dos vasos do espaço paraolfatório basal penetrando no parênquima nervoso, após injeção de solução hipertônica de cloreto de sódio a 20/1000, por via intravenosa e de tinta da Índia a 1% por via subaracnoidal em 10 cães de raças diferentes e mantendo outros 6 como controle. O estudo foi realizado utilizando o método de Mallory no material que era cortado em secções de 20 micra seriadas, indo da superfície até 10mm de profundidade executando com a câmara lúcida 10 desenhos dos vasos e da membrana pio-glial em cada caso. Cada desenho era depois estudado separadamente calculando em mm com o planímetro a área dos vasos e a área da membrana pio-glial. A análise estatística revelou um aumento significativo do espaço perivascular pela ação da solução hipertônica, o que parece ser expressão do comportamento osmométrico da membrana pio-glial, que assim não pode ser considerada como estrutura estática mas parte integrante no complexo neurônio-glia-meninge.

## SUMMARY

*Effects of endovenous hipertonic solution in the cerebral perivascular spaces in dogs.*

The authors studied the behavior of vessels penetrating the nervous parenchyma in the basal paraolfactory space after an intravenous injection of the hipertonic sodium chloride solution (20/1000), plus a 1% India ink solution injected via subarachnoidal space. The experiments were performed in 10 dogs of different races keeping 6 as controls.

The experiment followed Mallory's method and consisted in cutting series of 20 microns sections, going from the surface down to 10mm deep, 10 plates (in each case) of the vessels and the picroglial membrane were drawn up with the aid of a "camera lucida". The statistical analysis showed a significant enhance in the perivascular space due to the hipertonic solution which seems to results from an osmotic phenomenon through the picroglial membrane. In this way, the picroglial membrane can be considered as an active structure in the neuronal-glial-meninge complex.

## REFERENCIAS

1. AKER, D. — A study of hematic barrier in peripheral nerves of albino rabbits. *Anat. Rec.* 174:21, 1972.
2. BAIRATI, A. — Problemi vecchi e nuovi della glia. *Sistema Nervoso (Milano)* 1:1-4, 1950.
3. BAIRATI, A. — Perivascular relationship of the neuroglia cells. *In Biology of Neuroglia* — W. Windle ed. Charles C. Thomas, Springfield (Illinois), 1958, pag. 85-98.
4. BRIERLEY, J. B. — The blood brain barrier: structural aspects. *In Metabolism of the Nervous System*, — D. Richter ed., New York, Pergamon Press, 1957, pag. 121-135.
5. CONTU, P. — Observações experimentais sobre os espaços perivasculares no cão (nota prévia). *Arq. Inst. Anat. Porto Alegre* 6:5-20, 1963-64.
6. GADRAT, J. — De l'Espace Perivascular du Cerveau et de la Moelle. Librairie Ballière et Fils, Paris, 1931.
7. GIMENO, A. L. & DE GIMENO, M. A. F. — Nociones de Fisiologia Celular. Editorial Universitária, Buenos Aires, 1963.
8. GLEES, P. — Neuroglia: Morphology and Function. Charles C. Thomas, Springfield (Illinois), 1953.
9. HIS, W. — Ueber ein perivascularen Canalsystem in der Centralorganen und ueber dessen Beziehung zum Lymphsystem. *Zeitsch. f. Wiss. Zool.*, 15:127, 1865.
10. KUHLEMBECK, H. — Virchow-Robin spaces, spaces of His-Held and their relation to the membrana limitans perivascularis. *Anat. Rec.*, 109:375, 1951.

11. NABESHIMA, S.; REESE, T. S.; LANDIS, D. M. D. & BRIGHTMAN, M. W. — Junctions in the meninges and marginal glia. *J. Comp. Neur.* 164:127, 1975.
12. OLDENDORF, W. H. — The Blood-Brain Barrier. *Exp. Eye Res. Suppl.* 177-190, 1977.
13. OLSSON, Y REESE, T. S. — Permeability of vasa nervorum and perineurium in mouse sciatic nerve studied by fluorescence and electron microscopy. *J. Neuro-path. Exper. Neurol.* 30: 105, 1971.
14. PATEK, P. R. — The perivascular spaces of the mammalian brain. *Anat. Rec.* 88:124, 1944.
15. REESE, T. S. & KARNOVSKY, M. J. — Fine structural localization of blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol.* 34:207, 1967.
16. ROBIN, C. — Recherches sur quelques particularités de la struture des capillaires de l'encephale. *Journal de la Physiologie Des Hommes et des Animaux.* 2:537, 1850.
17. SCHALTENBRAND, G. & BAILEY, P. — Die perivascularre Pia-gliamembran des Gehirns. *J. Psychol. Neur.*, 35:199, 1928.
18. TSCHIRG, R. D. — The Blood-brain Barrier. In *Biology of Neuroglia*, W. Windle ed., Charles C. Thomas. Springfield (Illinois), 1958, pág. 130-138.
19. VIRCHOW, R. — Ueber die Erweiterung kleinerer Gefaesse. *Arch. f. Pathol. Anat.* 3:427, 1851.
20. WEED, L. A.— An anatomical consideration of the cerebrospinal fluid. *Anat. Rec.* 12:461, 1917.
21. WESTERGAARD, E. & BRIGHTMAN, M. W. — Transport of proteins across normal cerebral arterioles. *J. Comp. Neurol.* 152:17, 1973.
22. WOOLLAM, D. H. & MILLEM, J. W. — The perivascular spaces of the mammalian central nervous system and their relation to the perineuronal and subaracnoid spaces. *J. Anat. (London)*, 89:193, 1955.

*Laboratório de Neuroanatomia, Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Biociências da UFRGS — Rua Sarmiento Leite s/n. — 90000 — Porto Alegre, RS — Brasil.*