

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

**NEUROTOXICIDADE COMPARATIVA DO IOBITRIDOL COM O
IOHEXOL POR VIA INTRACISTERNAL EM RATOS WISTAR.**

Dissertação de Mestrado

Fabíola Peixoto da Silva Mello

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

**NEUROTOXICIDADE COMPARATIVA DO IOBITRIDOL COM O
IOHEXOL POR VIA INTRACISTERNAL EM RATOS WISTAR.**

Fabíola Peixoto da Silva Mello

Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Farmacologia
e Toxicologia.
Orientador: Prof. Dr. João Roberto
Braga de Mello.

PORTO ALEGRE
2011

M527n Mello, Fabíola Peixoto da Silva
Neurotoxicidade comparativa do iobitridol com o iohexol, por via
intracisternal , em ratos Wistar. / Fabíola Peixoto da Silva Mello. – Porto
Alegre : UFRGS, 2011.

91 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2011. João Roberto Braga de Mello, Orient.

1. Farmacologia veterinária 2. Meios de contraste 3. Neurotoxicidade
4. Mielografia I. Mello, João Roberto Braga de, Orient. II. Título.

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Fabíola Peixoto da Silva Mello

NEUROTOXICIDADE COMPARATIVA DO IOBITRIDOL COM O IOHEXOL POR VIA INTRACISTERNAL EM RATOS WISTAR.

APROVADA POR:

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernanda Bastos de Mello
Membro da Comissão

Prof. Dr. Carlos Afonso de Castro Beck
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais e a minha família pelo incentivo e apóio nessa etapa da minha vida.

Ao meu namorado, pelo carinho, alegria, apóio e ajuda nas várias etapas de realização deste trabalho.

Ao meu orientador, pela oportunidade, aprendizado e auxílio.

À Fernanda, pelo incentivo, apóio, atenção e ajuda que me foram tão importantes.

À equipe do laboratório, em especial a Clarissa, ao Rafa e a Tati, pelo apoio, amizade, disponibilidade e grande ajuda que me forneceram.

À Aline pela amizade, disponibilidade e enorme auxílio durante a realização desse trabalho.

Ao Renato e a Karin, cujas trocas de idéias foram fundamentais na melhoria da condução do experimento.

Aos funcionários do CREAL pelo cuidado para com os animais do meu experimento.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS por disponibilizar a estrutura para a realização do experimento.

Ao prof. Aldo e o restante da equipe do Departamento de Fisiologia, pela atenção e empréstimo do aparelho de estereotaxia.

Ao Eduardo, ao prof. David e ao restante da equipe do Setor de Patologia da UFRGS pela realização das análises histopatológicas.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivos gerais.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. HIPÓTESE.....	18
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
4.1 Aspectos históricos dos meios de contraste iodados.....	19
4.2 Considerações químicas sobre os meios de contraste iodados.....	22
4.3 Utilização de meios de contraste iodados em mielografias.....	26
4.4 Testes de neurotoxicidade dos meios de contraste iodados.....	28
4.5 Resultados de testes de neurotoxicidade.....	30
4.5.1 Testes de neurotoxicidade com o iobitridol.....	30
4.5.2. Testes de neurotoxicidade com outros meios de contraste iodados realizados em ratos e camundongos.....	31
4.5.3 Testes neurotoxicidade com outros meios de contraste realizados em coelhos.....	33
4.5.4 Testes de neurotoxicidade com outros meios de contraste realizado em cães.....	34
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
5.1 Animais.....	35
5.2 Substâncias utilizadas na administração intracisternal.....	36

5.3 Grupos experimentais.....	37
5.4 Protocolo experimental.....	39
5.4.1 Preparação dos animais e anestesia.....	39
5.4.2 Identificação do local a ser puncionado.....	39
5.4.3 Administração das substâncias e realização das radiografias.....	41
5.4.4 Avaliações clínicas.....	43
5.5 Eutanásia e necropsia.....	44
5.6 Análise estatística.....	47
6. RESULTADOS.....	49
6.1 Sinais de depressão e excitação.....	49
6.1.1 Sinais de depressão.....	49
6.1.2 Sinais de excitação.....	49
6.2 Óbitos e alterações no trato respiratório.....	52
6.2.1 Óbitos.....	52
6.2.2 Alteração no padrão respiratório.....	52
6.2.3 Secreção nasal	52
6.3 Teste dos reflexos, reações e resposta auditiva.....	54
6.3.1 Teste dos reflexos tátil de agarramento palmar, flexor e extensor.....	54
6.3.2 Testes dos reflexos palpebral, pupilar e da pina.....	54
6.3.3 Teste da reação de endireitamento, posicionamento e resposta auditiva.....	58
6.3.4 Outras alterações neurológicas observadas.....	60
6.4 Massa corporal e consumo de ração e água (%).....	61
6.4.1 Massa corporal.....	61
6.4.2 Consumo percentual de ração (%).....	63
6.4.3 Consumo percentual de água (%).....	65
6.5 Achados de necropsia e análise histopatológica.....	67
7. DISCUSSÃO.....	68
7.1 Sinais de depressão e excitação.....	69
7.1.1 Sinais de depressão.....	69
7.1.2 Sinais de excitação.....	70
7.2 Óbitos e alteração no trato respiratório.....	71
7.2.1 Óbitos.....	71
7.2.2 Alteração no padrão respiratório.....	74

7.2.3 Secreção nasal.....	75
7.3 Teste dos reflexos, reações e resposta auditiva.....	76
7.3.1 Teste dos reflexos de agarramento, flexor e extensor.....	76
7.3.2 Testes dos reflexos palpebral, pupilar e da pina.....	77
7.3.3 Teste da reação de endireitamento, posicionamento e resposta auditiva.....	78
7.3.3 Outras anormalidades encontradas.....	79
7.4 Massa corporal e consumo de ração e água (%).....	80
7.4.1 Massa corporal.....	80
7.4.2 Consumo percentual de ração e água (%).....	81
7.5 Achados macroscópicos e análise histopatológica.....	81
7.6 Avaliação geral dos dados obtidos.....	82
8. CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores de DL50 dos meios de contraste iodados em Camundongos IV.....	21
TABELA 2 - Avaliação, por pontuação, dos ratos submetidos à aplicação intracisternal de iobitridol, iohexol e NaCl 0,9%, conforme sinais de excitação (estado de alerta e padrão de locomoção), e de depressão (presença de movimentos involuntários e sinais de aumento de responsividade).....	44
TABELA 3 – Descrição da forma de avaliação para identificação de respostas normais dos reflexos, reação de endireitamento e posicionamento, e teste auditivo.....	45
TABELA 4 - Propriedades físico-químicas do iohexol e do iobitridol.....	83

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Estrutura molecular de alguns meios de contraste (adaptado de Aspelin, et al. 2009).....22
- FIGURA 2 - Viscosidade de alguns meios de contraste de baixa osmolalidade a 300 mg I/kg (adaptado de Stacul & Thomsen, 1996).....25
- FIGURA 3 - Esquema de distribuição aleatória dos ratos em três grupos experimentais com 25 animais cada, sendo um grupo para cada meio de contraste, e um grupo controle. Cada grupo foi subdividido em cinco subgrupos com cinco animais cada. Nos grupos que receberam os meios de contraste por via intracisternal, cada subgrupo recebeu uma dose distinta equivalente a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg. O grupo controle recebeu pela mesma via, solução estéril de NaCl 0,9% em volume equivalente ao empregado nos meios de contraste testados.....37
- FIGURA 4 – Posicionamento do rato no estereotáxico, com as barras auriculares suspensas a uma distância de 52 mm da base do rato fixada com a barra de fixação em um ângulo de 110° com relação à superfície horizontal, permitindo a correta introdução da agulha (adaptado de Lebedev et al., 2004).....38
- FIGURA 5 - Rato após indução anestésica e tricotomia da região cervical, preso no estereotáxico através das barras auriculares e mantido com isoflurano através de máscara.....39
- FIGURA 6 – Rato anestesiado com isoflurano, preso no aparelho de estereotaxia com auxílio das barras auriculares, com a correta ventroflexão da cabeça. Após antissepsia com álcool iodado, determinação do ponto mais móvel entre o osso parietal e coluna vertebral, para determinação do local de introdução da agulha.....40
- FIGURA 7 - Características espaciais da cisterna cerebral de ratos Wistar. Distância no ponto médio entre o osso parietal e coluna vertebral, da pele até a dura mater varia de 4,5 a 5,5, conforme o peso do animal (adaptado de Lebedev et al., 2004).....40

FIGURA 8 – Rato corretamente posicionado no aparelho de estereotaxia, com ventroflexão da cabeça. Após introdução da agulha, verificação do ponto correto através do efluxo de fluido cerebrospinal translúcido.....	41
FIGURA 9 - Rato no aparelho de estereotaxia, preso com as barras auriculares. Após a troca da seringa, por uma previamente preenchida com o volume de substância a ser utilizada, foi realizada a administração da mesma via intracisternal.....	42
FIGURA 10 - Compressão manual no local da injeção por um minuto antes da realização das radiografias.....	42
FIGURA 11 - Radiografia da região cervical do rato realizada dois minutos após a administração do meio de contraste no espaço subaracnóide, onde se verifica a correta localização do mesmo.....	43
FIGURA 12 - Sinais de depressão no comportamento dos ratos de 5 a 60 minutos do término da aplicação da substância (iohexol,iobitrido e NaCl 0,9%) por via intracisternal. Em cima das tabelas constam as doses diferentes e ao volume correspondente de NaCl 0,9%. Escore 0 = rato cheirando, sentando espontaneamente e com responsividade normal ao toque. Escore 1 = desorientação e/ou apatia e/ou lentidão dos movimentos. Escore 2 = imóvel, mas responsivo ao toque. Escore 3 = parestesia e/ou imóvel e irresponsivo.....	50
FIGURA 13 - Sinais de excitação no comportamento dos ratos de 5 a 60 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, iobitridol e NaCl 0,9%) por via intracisternal. Em cima das tabelas constam as doses diferentes e ao volume correspondente de NaCl 0,9%. Escore 0 = rato cheirando, sentando espontaneamente e com responsividade normal ao toque. Escore 1 = irritabilidade e/ou hiperreflexia. Escore 2 = convulsões parciais. Escore 3 = convulsões generalizadas.....	51
FIGURA 14 - Frequência de animais com sinais de alteração no padrão respiratório e presença de secreção nasal, durante ou logo após a aplicação da substância (iohexol, iobitridol, NaCl 0,9%) por via intracisternal. Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI /kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9%.....	53

- FIGURA 15 - Frequência de animais com os reflexos normais de agarramento, flexor e extensor após 5 minutos da aplicação da substância (iohexol, iobitridol, NaCl 0,9%) por via intracisternal. Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI /kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9%.....55
- FIGURA 16 - Frequência de animais com os reflexos palpebral, pupilar e da pila normais de após 5 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, iobitridol, NaCl 0,9%) por via intracisternal. Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI /kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9%.....57
- FIGURA 17 - Frequência de animais com os reação de endireitamento, reação de posicionamento e resposta auditiva normais de após 5 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, iobitridol, NaCl 0,9%) por via intracisternal. Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI /kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9%.....59
- FIGURA 18 - Variação da massa corporal percentual (%) dos animais nos dias subseqüentes à aplicação da substância (iohexol, iobitridol e NaCl 0,9% por via intracisternal), em comparação ao dia 0. Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI /kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9% (n= 5 animais por grupo.....62
- FIGURA 19 - Variação no consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal dos animais nos sete dias subseqüentes à aplicação da substância (iohexol, iobitridol e NaCl 0,9% por via intracisternal). Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI /kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9% (n= 5 animais por grupo.....64
- FIGURA 20 - Variação no consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal dos animais nos sete dias subseqüentes à aplicação da substância (iohexol, iobitridol e NaCl 0,9% por via intracisternal). Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI /kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9% (n =5 animais por grupo).....66
- FIGURA 21 - Necropsia de um dos ratos do experimento, que veio à óbito durante o procedimento, não havendo sinais de alteração macroscópica.....67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cP –	centi-Poise, unidade de viscosidade dinâmica
CREAL –	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
DL50 –	dose efetiva capaz de provocar óbito em 50% dos animais testados
EB50 –	dose efetiva capaz de provocar distúrbio de comportamento em 50% dos animais
I –	iodo
IC -	intracisternal
IV –	intravenosa
kg –	quilograma (s)
LCE –	líquido cérebro-espinhal
MC –	meio de contraste
mg –	miligrama(s)
mOsm-	miliosmol
ppm -	parte por milhão
q.s.p. -	quantidade suficiente para
RM –	ressonância magnética
SNC -	sistema nervoso central
TC –	tomografia computadorizada
UFRGS -	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

Os meios de contraste iodados são substâncias radiopacas utilizadas em mielografias e, muito embora o iohexol e o iopamidol sejam considerados seguros na rotina mielográfica de humanos e animais, eventos adversos são relacionados ao seu uso. O iobitridol foi desenvolvido mais recentemente, sendo seu desenho molecular obtido após pesquisas sobre a conformação, distribuição e natureza permanente da estrutura hidrofílica; no entanto, estudos referentes à neurotoxicidade do iobitridol com administração subaracnóide são escassos e inconclusivos. O objetivo do presente trabalho foi comparar a neurotoxicidade do iobitridol com a do iohexol, por via intracisternal em ratos Wistar, como avaliação pré-clínica da utilização deste como agente mielográfico. Foram utilizados 75 animais divididos em três grupos experimentais de 25 animais: iobitridol, iohexol e NaCl 0,9% (grupo controle), e; estes subdivididos em cinco subgrupos com cinco animais cada, com doses distintas de 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg, sendo utilizado no grupo controle o volume equivalente aos meios de contraste testados. Os animais foram avaliados no momento da aplicação do iohexol e iobitridol quanto a alterações do trato respiratório, e posteriormente, aos 5, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após este procedimento, quanto a sinais de depressão e excitação, reflexos tátil de agarramento palmar, flexor, extensor, palpebral, pupilar e da pua, reação de endireitamento e posicionamento e resposta auditiva. Nos sete dias subsequentes, foram avaliados diariamente quanto a estes parâmetros, e ainda mensurados o peso e a ingestão de ração e de água. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos testados com meios de contraste, em nenhum dos parâmetros avaliados. Nesse modelo animal o iobitridol demonstrou baixa neurotoxicidade, comparável a observada com o iohexol, tornando-o uma possibilidade alternativa para utilização pela via subaracnóidea para realização de mielografias.

Palavras-chave: meio de contraste, iobitridol, iohexol, neurotoxicidade, intracisternal, mielografia

ABSTRACT

The iodinated contrast agents are radiopaque substances used in myelography, and although the iohexol and iopamidol are considered safe in human and animal myelographic routine, adverse events are related to their use. The iobitridol was recently developed, and its molecular designs obtained after research on the configuration, distribution and permanent nature of hydrophilic structure; however, neurotoxicologic studies of iobitridol in subarachnoid administration are scarce and inconclusive. The purpose of this study was to compare the neurotoxicity of iobitridol with iohexol, by intracisternal administration in Wistar rats, as pre-clinical evaluation of the use of this substance as myelographic agent. Seventy five animals were used, divided into three experimental groups with twenty five animals: iobitridol, iohexol and NaCl 0,9% (control group); and they are divided into five subgroups of five animals each, with different doses of 200, 400, 600, 800 and 1000 mg I/kg, while the control group received the equivalent volume of contrast media tested. The animals were evaluated during injection of iohexol and iobitridol on changes of respiratory tract, and subsequently at 5, 15, 30, 60, 120, 180 and 240 minutes after this procedure, for signs of depression and excitement, tactile palmar grasp, flexor, extensor, palpebral, papillary and pinna reflexes, surface righting and placing reactions, and auditory startle test. The evaluations were assessed daily for seven days these parameters, and the body weight and food and water intake were also measured. There were no statistically significant differences between groups tested with respect to any of the evaluated parameters, in other words, in this animal model, the iobitridol demonstrated low neurotoxicologic potential, comparable to the observed with iohexol. In conclusion, iobitridol should be a safe alternative to myelography.

Key words: *Contrast media, iobitridol, iohexol, neurotoxicity, intracisternal, myelography*

1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico por imagem tem sido uma parte integrante da medicina desde a descoberta dos raios X por Roentgen em 1895. Uma vez que os raios X não são suficientemente absorvidos pelo tecido mole, os meios de contraste (MC) são utilizados para realçar órgãos e afecções, atuando através do aumento da diferença na atenuação da radiação entre vários tecidos e órgãos, permitindo melhor visualização das estruturas dentro do corpo (WEINMANN et al., 2005; ASPELIN et al., 2009).

Uma das possíveis formas de divisão dos MC radiológicos é em positivo e negativo. Os MC positivos atenuam os raios X mais do que os tecidos moles do corpo e podem ser divididos em agentes à base de iodo e de bário (ASPELIN et al., 2009). A molécula de iodo efetivamente absorve os raios X, permitindo uma excelente visualização da estrutura anatômica (BOURIN et al., 1997). Já os negativos, atenuam menos os raios do que os tecidos moles do corpo (ASPELIN et al., 2009), incluem o ar ou dióxido de carbono, e são de pouco interesse para os farmacologistas (BOURIN et al., 1997).

O MC positivo ideal confere opacificação dos vasos sanguíneos, tecidos ou órgãos sem acompanhamento de toxicidade ou alteração na função fisiológica (BOURIN et al., 1997). Além de biologicamente inerte, deve ser altamente solúvel em água, ter estabilidade química e ao calor, baixa viscosidade, excreção seletiva e custo razoável (SPENCER; GOA, 1996).

Os MC iodados são utilizados em angiografias, mielografias, tomografias computadorizadas (TC) e outras pesquisas radiológicas convencionais, podendo inclusive ser administrados diretamente nas cavidades do trato gastrointestinal e do trato urinário (ASPELIN et al., 2009). Eles estão entre os fármacos mais utilizados pela via intravascular, e sua farmacocinética é relativamente simples: quando administrados via intravascular, passam por rápida distribuição através desse espaço, e rapidamente se espalham através de todo o espaço extravascular. São excretados essencialmente pela filtração glomerular, com meia vida menor do que 60 minutos, e; há mínima ligação protéica e mínima excreção hepática, mesmo na presença de disfunção renal (BETTMANN, 2005; CHRISTIANSEN, 2005). Exceções a essa forma de ligação com a proteína sérica e a eliminação, são os meios de contraste iodados biliares, como o iotroxato de meglumine (BOURIN et al., 1997).

Na mielografia, a administração de MC via subaracnóidea é requerida para permitir o delineamento da medula espinhal e das raízes nervosas, do fluido cerebrospinal circundante e cobrir as meninges (KATAYAMA et al., 2001). Não apenas a existência, mas também a localização das lesões espinhais pode ser diagnosticada pela mielografia (SHIMIZU, 2008). Porém sabe-se que essa via de administração é muito mais tóxica do que a injeção intravascular, e que; indiferente ao agente utilizado, a toxicidade aumenta com a dose administrada e o tempo de contato com o sistema nervoso central (SNC) (TORVIK; WALDAY, 1995).

Com a introdução de procedimentos de imagem não-invasivos e mais precisos como a ressonância magnética (RM) e a TC, a mielografia em humanos ficou reservada a casos em que os achados através da avaliação neurológica, junto com a RM e a TC, não são conclusivos ou necessitam de elucidação, como por exemplo, em alguns casos onde há artefatos de metal decorrentes de fixação cirúrgica (MALY et al., 1995a; KATAYAMA et al., 2001). Deve-se lembrar que, apesar de ser mais invasiva, a mielografia é de fato muito superior aos demais exames citados acima, no que diz respeito à visualização das raízes nervosas (PALMERS et al., 2002). Ela também pode ser utilizada no diagnóstico de algumas doenças infecciosas, carcinomatose de meninge, alterações aracnóideas ou lesões vasculares (KATAYAMA et al., 2001).

O interesse dos efeitos colaterais associados à utilização dos MC iodados em mielografia e a procura por um meio menos tóxico, também é importante porque, no que se refere à Medicina Veterinária, a mielografia continua sendo o método de escolha devido a maior viabilidade do equipamento. Mesmo em países como os EUA, em que a tomografia computadorizada é mais difundida no meio veterinário, a mielografia é considerada uma alternativa rápida e econômica para avaliação da medula espinhal (NEGRIN et al., 2009).

Dados disponíveis a respeito da habilidade da TC em identificar com sucesso a herniação de disco em cães em comparação a mielografia são limitados (ISRAEL et al., 2009), assim, esta continua sendo o método de escolha para diagnosticar herniação de disco intervertebral (TANAKA et al., 2004). Outros dados importantes na seleção da modalidade de diagnóstico por imagem (TC ou mielografia), mesmo quando o equipamento está disponível, deve ser baseada em fatores como custo, tempo de anestesia, viabilidade de pessoal de suporte, preferência pessoal e possibilidade potenciais efeitos adversos; além disso, a mielografia deve ser preferida em cães com

menos de 5 kg enquanto a TC em casos de suspeita de doença crônica. (ISRAEL et al, 2009).

Embora o iohexol e o iopamidol sejam considerados seguros na rotina mielográfica de humanos e animais, eventos adversos relacionados ao uso são observados, tais como náuseas, vômitos e convulsões. Já o iobitridol, outro MC tri-iodado que assim como o iohexol e o iopamidol, é um monômero, não iônico, com baixo peso molecular e alto grau de hidrofiliidade, não tem a indicação por esta via por possuir estudos escassos e inconclusivos referentes à neurotoxicidade (WIDMER, 1992).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Contribuir para o conhecimento da neurotoxicidade dos meios de contraste radiológicos, através da avaliação comparativa da tolerabilidade do SNC ao iobitridol em ratos, verificando sua viabilidade para utilização como alternativa em mielografias, bem como, em aplicações venosas ou arteriais em pacientes com possibilidade de disfunção da barreira hematoencefálica, onde o contato do meio de contraste com o SNC torna-se maior devido sua maior difusão através desta.

2.2 Objetivos específicos

Avaliação do ensaio pré-clínico da utilização do iobitridol como agente de contraste mielográfico, através da sua utilização intracisternal em ratos.

Determinação do risco neurológico da utilização intracisternal de iobitridol em ratos, comparado ao iohexol.

Avaliação da eficácia do método de contenção utilizado através do aparelho de estereotaxia, com posterior manutenção da agulha e compressão digital local por um minuto para a mensuração da neurotoxicidade de substâncias aplicadas por via intracisternal.

Avaliação de testes de reflexos tátil de agarramento palmar, flexor, extensor, palpebral, pupilar e da pina, reação de endireitamento e posicionamento e resposta auditiva como padrão para avaliação de neurotoxicidade dos MC iodados.

3. HIPÓTESE

A neurotoxicidade do iobitridol, quando aplicado via IC em ratos, é menor do que a observada pelo iohexol, o qual se constitui um MC iodado rotineiramente empregado em mielografias, tanto em animais quanto em humanos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Aspectos históricos dos meios de contraste iodados

A primeira descrição do uso de meios de contraste foi realizada em menos de um ano após a descoberta dos raios X por Roentgen em 1885, na mão de um cadáver, cujos vasos sanguíneos foram preenchidos com suspensão contendo cálcio e mercúrio (ALMÉN, 1995; BETTMANN, 2005).

Os primeiros relatos de meios de contraste utilizados *in vivo* foram o bismuto e o iodeto inorgânico (WEINMANN et al., 2005). Foi observado que o iodo de sódio inorgânico era muito tóxico para uso na rotina clínica, mas o desenvolvimento de componentes orgânicos levou a um uso mais amplo dos componentes iodados (SAGE, 1983; BOURIN et al., 1997). Na década de 1920, em Berlin, Binz e Rãth sintetizaram uma molécula orgânica iodada, a piridona não iônica com apenas um iodo aderido, a qual Swick usou em estudos clínicos em 1929 como primeiro meio de contraste para urografia, o Uroselectan; e desde então o iodo tem permanecido como o agente radiopaco mais amplamente utilizado para injeção no leito vascular (BOURIN et al., 1997; BETTMANN, 2005; WEINMANN et al., 2005). Em decorrência dos estudos iniciais, a urografia tornou-se de uso global e também houve um contínuo desenvolvimento de meios de contraste solúveis em água, revelando níveis de toxicidade decrescentes, primeiro para urografia e angiografia e depois para mielografia, TC, e outras aplicações (ALMÉN, 1995).

Nos três anos subsequentes, Binz e Rãth desenvolveram uma série de componentes adicionais (BETTMANN, 2005). Durante esse período, mais precisamente em 1931, foi proposto a utilização do metoidal de sódio, um meio de contraste mono-iodado, para emprego em mielografias, que foi usado até 1970, principalmente nos países escandinavos (TORVIK; WALDAY, 1995). Em 1933, Swick utilizou um anel de benzeno substituído, o iodopurato de sódio, o qual se constitui a base de todos os meios de contraste iodados subsequentes (MCCLENNAN, 1987; BETTMANN, 2005). Vinte anos mais tarde Wallingford e Hoppe desenvolveram um anel de benzeno totalmente

substituído, tri-iodado, denominado diatrizoado, e que apresentava reduzida toxicidade (BETTMANN, 2005).

Apesar do fato de existirem vários átomos com massa maior e que seriam melhores atenuadores da radiação do que o iodo, o diatrizoato produz poucos efeitos adversos biológicos, se comparados aos outros competidores não iodados. Soluções de contraste solúveis em água baseados em cobalto, níquel, cobre, zinco, bromo, estrôncio, cádmio, lantânio, céσιο, gadolínio, itérbio, chumbo e bismuto, já foram testados, mas apesar da eficácia em gerar radiopacidade, todos geram efeitos adversos mais sérios (ALMÉN, 1995).

Almén, no final dos anos 1960, desenvolveu o primeiro monômero não-iônico, a metrizamida, o qual ainda era derivado do anel de ácido benzóico com três átomos de iodo por molécula, porém sem o grupo carboxila ionizante. Esses componentes eram solúveis por incluir grande número de grupos hidrofílicos nas cadeias laterais (STACUL, 2001). A metrizamida começou a ser testada em animais e seres humanos no início da década de 1970 (MCCLENNAN, 1987), e sua baixa toxicidade intravascular (com DL50 - dose efetiva capaz de provocar morte em 50% dos animais - de 15-20 g I/kg de rato) e a baixa toxicidade subaracnóidea (DL50 > 1500 mg I/kg no rato), a levou a ser o primeiro meio de contraste solúvel em água de uso clínico generalizado na mielografia. De 10 a 30 vezes mais tolerada se comparada aos meios de contraste até então existentes, a administração subaracnóidea de metrizamida, além da menor osmolalidade, de duas a três vezes se comparado aos monômeros iônicos, foi marcada principalmente pela redução da quimiotoxicidade, devido a ausência do grupo carboxila e presença de grupos hidroxila (ALMÉN, 1995).

No entanto, a metrizamida não foi tão amplamente utilizada por possuir duas desvantagens: reduzida estabilidade a autoclavagem, requerendo que fosse produzida uma substância liofilizada que deveria ser diluída em água antes do uso, e; conseqüentemente, esse processo de liofilização resultou no aumento dos custos levando a ter um preço final muito alto para uso geral de grandes doses (SAGE, 1983; ALMÉN, 1995).

No final dos anos 1970, o desenvolvimento de MC iodados de baixa osmolalidade, iônicos (ioxaglato de sódio/meglumina) seguido por MC não-iônicos (iohexol, iopamidol, etc) resultou em marcada redução na incidência de efeitos adversos menores, assim como efeitos fisiológicos ligados à alta osmolalidade das soluções injetadas (DONADIEU et al., 1996). Como pode ser observado na Tabela 1 o iohexol e

iopamidol possuem DL50 maior do que a metrizamida, ou seja, toxicidade IV menor do que esta, o que é decorrente da presença das cadeias laterais carreadoras de hidroxila igualmente distribuídos ao redor da molécula do meio de contraste (ALMÉN, 1995).

Tabela 1 - Valores de DL50 dos meios de contraste iodados em camundongos IV.

	<i>Meio de contraste</i>	<i>DL50/g. kg⁻¹</i>
1 ^a geração	Iodeto de sódio	0,9 *
	Methiodal	2,5*
	Uroselectan	2,9*
2 ^a geração	Diatrizoato	7,2
	Ioxaglato	10
3 ^a geração	Metrizamida	18,1
	Io hexol	18,4
	Iopamidol	21,8

* Dados não disponíveis em camundongos e extraídos de ratos

Nota: adaptado de Bussi & Morissetti, 2005.

Outro ponto a ser salientado, no que se refere à evolução dos meios de contraste trata-se da esterilização. Wallingford descobriu que pequenas quantidades de cátions (ppm) podem catalizar a remoção do iodo durante a esterilização e que a adição de EDTA de cálcio dissódico como agente sequestrante pode prevenir tal processo. Fora isso, o io hexol e outros meios de contraste similares tinham a tendência a se deteriorar levando à liberação de iodo inorgânico quando submetidos às altas temperaturas requeridas na auto-clavagem (120°C). Com o pH abaixo de 5,5, o io hexol tolera a auto-clavagem sem deteriorização, porém o meio de contraste para angiografia não poderia ser usada em soluções de pH tão baixo, pois isso poderia causar grande redução na pressão aórtica. Uma solução encontrada para esse problema foi a dissolução do io hexol na solução tampão TRIS (2-amino-2[hidroximetil]-1,3-propanediol), também denominado trometamol, com pH 7,3 a 20°C, mas que à temperatura de 120°C leva o meio a pH igual a 5. Após auto-clavagem, quando reduzida a temperatura, o pH retorna a seu valor inicial (ALMÉN, 1995; SARMENTO et al., 2000).

O iobitridol foi desenvolvido posteriormente ao io hexol e ao iopamidol, sendo os primeiros trabalhos encontrados na literatura datando de 1994 (BOURRINET et al.). Seu desenho molecular foi obtido após pesquisas sobre a conformação, distribuição e

natureza permanente da estrutura hidrofílica (LUMIERE, 1995), e ele é caracterizado por alto nível de estabilidade tridimensional dos grupos hidrofílicos em torno dos lipofílicos do anel de benzeno tri-iodado, sendo considerado um meio de contraste eficiente e causador de poucas reações adversas na sua utilização intravenosa (PETERSEIN et al., 2003).

4.2 Considerações químicas sobre os meios de contraste iodados

O componente responsável pela radiopacidade dos MC iodados é o iodo, sendo que o restante da molécula carrega e protege os átomos de iodo no anel de benzeno (SPENCER; GOA, 1996). Todos os MC iodados disponíveis no mercado são derivados tri-iodados do anel de benzeno, com átomos de iodo na posição 2, 4 e 6 (exemplos disponíveis na Figura 1); enquanto as demais posições do anel são ocupadas por cadeias laterais destinadas a dar a alta solubilidade em água e baixa toxicidade (CHRISTIANSEN, 2005).

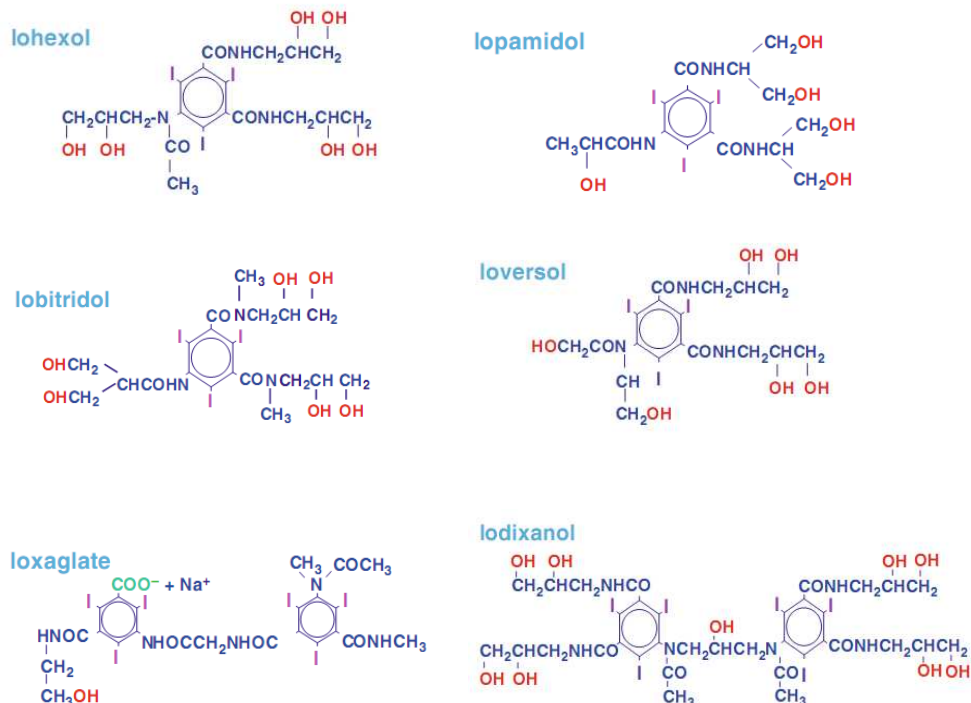


Figura 1 – Estrutura molecular de alguns meios de contraste iodados.

Nota: adaptado de ASPELIN et al., 2009.

Os meios de contraste podem ser subdivididos em quatro tipos: monômeros iônicos, dímeros iônicos, monômeros não iônicos e dímeros não-iônicos (CHRISTIANSEN, 2005). Os monômeros contêm um anel de benzeno tri-iodado, enquanto os dímeros contêm dois; e, a diferenciação entre iônico e não iônico é baseada na solubilidade em água, a qual no primeiro é alcançada pela formação de sal e no segundo não (VIOLON, 2001; ASPELIN et al., 2009). A água no corpo é polarizada de forma irregular com os polos positivos em torno dos átomos de hidrogênio e os polos negativos em torno dos átomos de oxigênio. Os agentes de contraste iônicos são solúveis em água por se dissociarem em íons positivos e negativos, os quais atraem as moléculas positivas e negativas da água (ASPELIN et al., 2009). Nesses casos o ânion é o ácido tri-iodobenzoico, enquanto o cátion é geralmente sódio, cálcio ou, a melhor tolerada, meglumina (DICKINSON; KAM, 2008). Já os agentes de contraste não-iônicos não se dissociam e são solúveis em água por seus grupos OH, pois os polos elétricos destes grupos são atraídos pelos polos elétricos das moléculas da água (ASPELIN et al., 2009). Desta forma, observa-se que o número de grupos hidroxila correlaciona-se em parte com a hidrofiliçidade do agente (STACUL; THOMSEN, 1996).

As gerações de contrastes mais novos são do tipo monômero não-iônicos, que possuem longas cadeias laterais ricas em grupos hidroxila uniformemente distribuídas em torno do núcleo de benzeno (CHRISTIANSEN, 2005). Estes podem possuir de 4 a 6 grupos hidroxila (quatro: iopromida; cinco: iopamidol, iomeproliopentol; seis: iohexol, iobitridol, ioversol) (STACUL; THOMSEN, 1996). Duas dessas cadeias laterais são geralmente idênticas, dando aos componentes uma estrutura bivalente. Diferentes MC são bastante similares na estrutura e podem possuir uma ou duas cadeias laterais em comum (CHRISTIANSEN, 2005).

Os MC iodados podem ser classificados conforme alguns fatores, como os mencionados acima: número de grupos hidroxila e hidrofiliçidade; e, outros tais como: estrutura química, osmolalidade, viscosidade, conteúdo de iodo, DL50, EB50 (a dose efetiva capaz de provocar distúrbio de comportamento em 50% dos animais) e possibilidade de cristalização (STACUL; THOMSEN, 1996; DICKINSON; KAM, 2008).

A osmolalidade parece ser inversamente proporcional à hidrofiliçidade (VIOLON, 2001). A indicação de osmolalidade do agente pode ser dada pela divisão do número de átomos de iodo na solução pelo número de partículas na solução. Assim, os

monômeros iônicos tem razão de 1,5 (três átomos de iodo por duas partículas na solução), os monômeros não-íonicos e os dímeros iônicos tem a razão de 3 (três átomos de iodo por partícula na solução) e os dímeros não iônicos tem a razão de 6 (seis átomos de iodo por partícula de solução) (ASPELIN et al., 2009).

Desta forma, os MC iodados mais antigos, os monômeros iônicos, têm alta osmolalidade e dependendo da concentração de iodo tem níveis maiores do que 1000 mOsm/kg H₂O – para efeitos de comparação é importante ter em mente que a osmolalidade do sangue é de 300 mOsm/kg (SPENCER; GOA, 1996; STACUL; THOMSEN, 1996). Exemplos destes são o diatrizoato, acetrizoato, metrizoato, iotalamato, iodamida e ioximalato, e englobam os derivados do ácido benzóico tri-iodado combinados com o sódio e/ou meglumina (SPENCER; GOA, 1996; BOURIN et al., 1997). Por serem hipertônicos em solução, alteram a tonicidade do plasma, acarretando a frequência comum de reações e efeitos adversos (BOURIN et al., 1997). Dentre estes citados, os comumente utilizados incluem o íon de iotamalato e diatrizole (DICKINSON; KAM, 2008).

Os três tipos de MC iodados de baixa osmolalidade incluem os: monômeros não iônicos, dímeros iônicos e não iônicos. Nas concentrações comumente usadas (25-76%) de monômeros não iônicos, a osmolalidade varia entre 290 e 860 mOsm/kg. São exemplos deste o iohexol, iopromida, iopamidol e o ioversol. O único dímero iônico clinicamente usado é o ioxaglato, utilizado em arteriografias (DICKINSON; KAM, 2008). Ele que tem osmolalidade de 600 mOsm/kg, mantendo uma posição intermediária entre a iônica e a não iônica. O iotrol e iodixanol são dímeros não iônicos, os quais são isotônicos com o sangue (300 mOsm/kg H₂O) (BOURIN et al., 1997).

A viscosidade da solução depende da estrutura molecular, com moléculas menores demonstrando menor viscosidade (VIOLON, 2001). A viscosidade do sangue normal é de 4 cP (centi-Poise - unidade de viscosidade dinâmica) do plasma é de 1,2 cP, e a de alguns meios de contraste de baixa osmolalidade podem ser observados na Figura 2. Em relação à administração, a viscosidade pode ter grande importância, porque a tendência tem sido a utilização de cateteres menores para lumens menores. Quanto maior a viscosidade, maior pressão tem que ser aplicada para injetar o meio de contraste. Por aquecimento do meio de contraste, esse problema pode ser de certa forma superado, sendo que a redução da concentração é também uma possibilidade; mas em angiografia coronariana, por exemplo, área esta onde o consumo é muito alto, soluções mais fracas, não são aplicáveis (STACUL; THOMSEN, 1996).

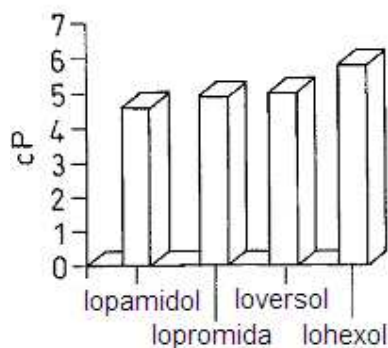


Figura 2 – Viscosidade de alguns meios de contraste de baixa osmolalidade (300 mg I/kg).

Nota: adaptado de Stacul & Thomsen, 1996.

A osmolalidade, viscosidade, hidrofiliçidade e solubilidade são inter-relacionadas e não podem ser todas otimizadas em conjunto, porque todos os critérios que melhoram a solubilidade, osmolalidade e hidrofiliçidade, são inversamente ruins para a viscosidade (BOURIN et al., 1997; VIOLON, 2001). Apesar disso, na prática clínica as diferenças de viscosidade presentes entre os meios de contraste não tem sido consideradas como fator de maior importância (STACUL; THOMSEN, 1996).

Quanto ao EB50, que reflete neurotoxicidade direta, existem algumas diferenças importantes entre os MC iodados. Por exemplo, o iopamidol tem um EB50 que é três vezes maior do que a iopromida. Essa maior neurotoxicidade é a razão pela qual a iopromida não é apropriada para mielografia. Já quanto a DL 50, para todos os MC de baixa osmolalidade, em camundongos ela é muito superior à observada nos MC de alta osmolalidade, o que levou a um aumento da dose máxima recomendada de 1000 mg I/kg para 2000 mg I/kg. As diferenças entre os MC de baixa osmolalidade é menor do que a observada entre monômeros iônicos e não iônicos (STACUL; THOMSEN, 1996).

A importância da cristalização, ainda é controversa. Alguns acreditam que não tem importância, enquanto outros são da opinião que os microcristais na circulação sanguínea podem ser lesivos (STACUL; THOMSEN, 1996).

4.3 Utilização de meios de contraste iodados em mielografias

Sabe-se que a administração subaracnóide de meio de contraste radiológico é muito mais tóxica do que a injeção intravascular (TORVIK; WALDAY, 1995). Reações neurológicas severas aos meios de contraste iodados em mielografias, tais como convulsões e risco de aracnoidite crônica, reduziram-se com a substituição dos meios iônicos por não-iônicos; no entanto, mesmo essas substâncias não-iônicas não são completamente inócuas, uma vez que eventualmente ainda são observados esses efeitos colaterais e outros menores, tais como: náusea, dor de cabeça e vômito (HARIA; BROGDEN, 1997).

Deve-se também ter em mente que o tipo e a frequência das reações adversas associadas à mielografia são sensíveis indicadores da neurotoxicidade do meio de contraste e é capaz de prever reações neurológicas adversas seguidas da administração intravenosa (IV) em pacientes com problemas na barreira hematoencefálica (MALY et al., 1995b). Essa, após ser danificada, acarreta em exacerbação da exposição das células neurais, o que pode ser observado, por exemplo, em casos de tumores intracerebrais, esclerose múltipla, edema cerebral isquêmico, alcoolismo e na síndrome da imunodeficiência adquirida (LUZZANI et al., 1996).

O MC adequado para mielografia deve ter três propriedades básicas: produção de nível de radiopacidade radiológica aceitável após se misturar com o líquido cérebro-espinhal – LCE (isto é, deve produzir imagens com adequada qualidade diagnóstica); exibição de completa absorção do compartimento do LCE em pouco tempo, seguida por rápida excreção sistêmica, e; deve ser seguro e bem tolerado pelos pacientes (KATAYAMA et al., 2001). Os mais comumente utilizados nesse procedimento, tanto na medicina humana, quanto veterinária, são o iohexol e o iopamidol, que são substâncias hidrossolúveis, não-iônicas e comprovadamente eficazes no diagnóstico (SARMENTO et al., 2002).

Há pouca informação a respeito do risco de convulsões induzidos por outros MC não-iônicos, que não a metrizamida, e os resultados de bioensaios disponíveis na literatura são conflitantes (KLEIN et al., 2004). Quando avaliados os efeitos neurotóxicos em humanos, os quadros de convulsões são raros, porém efeitos adversos menores, tais como: dor de cabeça, vômito e náusea são observados com incidência maior do que 50%, tanto com utilização do iohexol quanto do iopamidol (LARSEN et al., 1995). Outros sinais adversos observados incluem tonturas, cansaço, distúrbios

visuais e alterações na pressão sanguínea (FIIRGAARD et al., 1995). Mudanças psíquicas transitórias têm sido demonstradas com considerável frequência após mielografias com iohexol; e a meningite asséptica sintomática é outra complicação, apesar de rara (TORVIK; WALDAY, 1995; BENDER et al., 2004). Os efeitos adversos em humanos aparecem geralmente de 2 a 12 horas após a injeção e geralmente desaparecem em 24-72h. (TORVIK; WALDAY, 1995)

Em cães, as complicações mielográficas associadas à neurotoxicidade incluem: demora para recuperação da anestesia, intensificação de sinais neurológicos pré-existentes, hipertermia, hiperestesia, apnéia, vômito, convulsão, meningite asséptica, arritmias cardíacas, assístole, hemorragia intracraniana subaracnóide e morte (LEWIS; HOSGOOD, 1992; WIDMER et al., 1992; SARMENTO et al., 2000; ISERI et al., 2004; HECHT et al., 2009; ISRAEL et al., 2009). Quando comparados ao homem, a frequência de convulsões na rotina clínica de pequenos animais induzida pelos agentes mielográficos é maior e constitui o efeito adverso mais frequentemente observado (SARMENTO et al., 2000). O risco de convulsões varia nos cães, conforme o trabalho pesquisado, de 0- 21% dos casos. Fatores que interferem nessa disparidade incluem o peso do animal, local da administração (incidência maior de efeitos adversos na aplicação cervical, se comparado a lombar), gênero, raça (machos e dobermans com maior risco), achados clínicos e a frequência de administrações (LEWIS; HOSGOOD, 1992; FATONE, 1997; BARONE et al., 2002).

Com a utilização do iopamidol, Vesce et al. (2005) avaliaram mielografias em 114 cães e seis gatos, e observaram casos de convulsões em 12% dos cães e 17% dos gatos, ocorrendo durante ou logo após a recuperação do animal. Também observaram outras reações adversas como apnéia, bradicardia e hipotensão.

As alterações nas frequências respiratórias e cardíacas nesses animais não são raras. Em um estudo realizado por Fatone et al. (1997), durante a aplicação de iohexol e iopamidol em cães, observou-se que 11% apresentaram alteração do padrão respiratório e 0,4%, da frequência cardíaca. Essa alteração transitória pode ser explicada pelo aumento da pressão do fluido cerebrospinal durante a aplicação do contraste.

A neurotoxicidade do MC é associada às suas propriedades, como a quimiotoxicidade e osmolalidade. A quimiotoxicidade está relacionada a fatores de lipossolubilidade (quanto mais lipossolúvel, maior a neurotoxicidade) e a sua estrutura molecular; enquanto a osmolalidade aumentada provoca um desbalanço neuronal iônico

e permite que um grande número de moléculas entrem no líquido cerebrospinal e fluido extracelular (BARONE et al., 2002).

Embora o iopamidol e iohexol sejam considerados seguros na rotina mielográfica de humanos e animais, são observados eventos adversos relacionados ao uso; no entanto, estudos referentes à neurotoxicidade do iobitridol com administração subaracnóide são escassos e inconclusivos (WIDMER et al., 1992). Este trata-se de um agente de contraste tri-iodado, monômero, não-iônico, com baixo peso molecular e que possui um alto grau de hidrofiliabilidade devido a sua singular estabilidade conformacional, ou seja, é uma molécula que não sofre deformação em contato com membranas lipofílicas, limitando assim risco de interação com o meio biológico (TROCHERIE et al., 1995; DECAUSSE et al., 1996; LEFEVRE et al., 1996). Não se liga a proteínas plasmáticas e é principalmente eliminado na urina, podendo inclusive ser dialisado (BOURRINET et al., 1995). Ele é indicado, segundo o fabricante, para utilização em angiografia e urografia excretora, não havendo indicação para sua utilização mielográfica por ausência de estudos específicos.

4.4 Testes de neurotoxicidade dos meios de contraste iodados

A neurotoxicidade pode ser mensurada através de vários parâmetros que dependem do MC, modo de administração e animal utilizado (CAILLE; ALLARD, 1988). Testes clínicos que expõem amostras relativamente pequenas de uma população de pacientes, com injeção subaracnóidea de doses clínicas desses meios, provavelmente irão demonstrar diferenças marginais entre eles ou falharão ao indicar a possibilidade de reações adversas severas que podem acontecer em um grande número de exames realizados na rotina; assim sendo, métodos que não expõem o SNC à quantidade elevada de determinado MC não-iônico, não permite classificá-lo conforme sua neurotoxicidade (MALY et al., 1995b).

A neurotoxicidade já foi anteriormente testada com MC em várias espécies animais como camundongos, ratos, porquinhos da índia, coelhos, gatos, cães e macacos, utilizando uma variedade de métodos comportamentais e eletrofisiológicos para esta avaliação (MALY et al., 1995a).

Estudos comportamentais em animais são sensíveis e bons indicadores da neurotoxicidade clínica de vários meios de contraste; porém, diferentemente dos efeitos excitatórios, os efeitos depressivos no comportamento animal podem ser mais difíceis

de interpretar em termos de reações adversas menores no homem, tais como dor de cabeça, tonturas, náusea e alterações psíquicas (SUNDGREEN et al., 1995; TORVIK; WALDAY, 1995).

A falta de homogeneidade entre os dados obtidos em estudos que avaliam o potencial tóxico dos meios de contraste tem sido imputada a variações de peso dos indivíduos da amostra, local de administração do contraste, gênero, raça, achados clínicos, número de administrações e histórico médico. A padronização das variáveis intercorrentes e homogeneidade podem ser obtidas com a utilização de ratos como modelo experimental (LEWIS; HOSGOOD, 1992; HARIA; BROGDEN, 1997; BARONE et al., 2002).

Geralmente a neurotoxicidade dos MC é avaliada após a administração intratecal (subaracnóidea) em roedores (TAKAHASHI et al., 1996). Dentre os métodos utilizados para esta avaliação em ratos existem os estudos comportamentais e motores após: injeção intracisternal (cisterna cerebelomedular); injeção pericerebral (ventrículo lateral); e, condicionamento aversivo após injeção intracisternal (SOVAK et al., 1980; LUZZANI et al., 1996).

A administração intracisternal (IC) em ratos pode ser realizada de duas formas: sem ou com a implantação crônica de uma cânula. No primeiro caso, os animais são anestesiados e colocados em um suporte que mantenha o rato com a cabeça flexionada ventralmente, então é introduzida uma agulha e administrado o MC que se deseja testar, realizando avaliações após término do efeito da anestesia (WIBLE et al., 1995). Já a utilização do método com implantação crônica de cânula é realizada com cateter que permite o livre movimento do rato na caixa e tem a vantagem de eliminar a anestesia no momento do teste, porém possui desvantagens como: é mais traumático e invasivo; o procedimento cirúrgico é complicado, a canulação deixa o animal altamente susceptível a infecções; e, a cânula pode facilmente ocluir (SOVAK et al., 1980; TAKASUGI, 2005).

A via pericerebral em ratos também pode ou não ser realizada com cânulas cronicamente implantadas no ventrículo lateral, consistindo na inserção de uma cânula 20G através de fissura na área atrás do arco zigomático, delineado pela parte anterior da bula timpânica e borda posterior do osso escamoso (SOVAK et al., 1982; SPECK et al., 1988; NOCE et al., 1994). As vantagens e desvantagens da implantação crônica das cânulas é similar às observadas no método de administração intracisternal (TAKASUGI, 2005).

Para a realização do teste de aversão condicionada, cânulas são implantadas de forma crônica no ventrículo cerebral dos ratos, sendo presas no crânio com cimento dentário (NOCE et al., 1996). O rato quando exposto a uma substância que causa mal-estar aprende a evitá-la no futuro, assim é administrado o MC em uma dada concentração e ao mesmo tempo oferecido água com flavorizante específico. Depois, para indicar o grau de aversão, é mensurada a ingestão relativa da água com esse flavorizante anteriormente utilizado e outro diferente (SOVAK et al., 1980; SOVAK et al., 1982).

Dos métodos relatados, o de administração intracisternal sem implantação de cânula, além da vantagem de não necessitar de procedimento cirúrgico para sua realização, trazendo maior conforto ao animal antes e após a aplicação, é bem tolerado pelo rato, facilmente realizado por uma única pessoa, não necessita conhecimento de cirurgia estereotáxica, requer pouco tempo para a realização e, os materiais utilizados são baratos e de fácil aquisição (TAKASUGI, 2005; NIROGI et al., 2009).

4.5 Resultados de testes de neurotoxicidade

4.5.1 Testes de neurotoxicidade com o iobitridol

O único teste de toxicidade aguda realizado em ratos, por via intracisternal, com o iobitridol, foi realizado apenas na dosagem de 380mg I/kg foi comparado ao iohexol, não sendo observadas mortes com a dose injetada. Também não houve diferença de massa corporal em comparação ao grupo controle e ao iohexol. A única alteração observada foi insuficiência pulmonar durando aproximadamente 5 minutos, sendo atribuída a anestesia, visto que ocorreu em proporções similares entre os grupos tratados e o controle (DONADIEU, 1996).

Em cães, há na literatura apenas um trabalho que relatou sua utilização para mielografia. Trata-se de um estudo de 2 casos clínicos, realizado por Trindade & Trindade (2006), no qual o iobitridol se mostrou eficaz, não sendo observadas alterações neurotóxicas associadas à sua utilização.

4.5.2. Testes de neurotoxicidade com outros meios de contraste iodados realizados em ratos e camundongos

Para a avaliação do potencial neurotóxico da administração intracisternal do ioversol, Ralston et al. (1989) fizeram um teste em ratos, onde os únicos efeitos tóxicos observados foram hipoatividade, hiperatividade, movimentos dos músculos mastigatórios e o ato de se limpar. Os ratos sobreviventes ganharam peso até o término do período de observação em 14 dias. Intensa hemorragia foi observada em torno das meninges dos ratos que foram a óbito imediatamente após a injeção, no entanto não foi observado sinais de lesão tecidual ou anormalidade do cérebro naqueles eutanasiados após 14 dias de observação. Quando comparado ao iohexol e iopamidol ele apresentou menor DL50.

Já Larssen et al. (1995) compararam em camundongos e ratos, por via intracisternal, a administração de iotrolan e de iodixanol. Os animais que morreram foram três camundongos com iodixanol e um rato com iotrolan. Movimentos espásticos do corpo foram observados iniciando cerca de 30 minutos após a injeção e persistindo por pelo menos uma hora e meia, sendo notado em todos os machos que receberam 1,5g I/kg de iotrolan, os quais voltaram ao normal após cinco horas. Um ou mais sinais clínicos como cabeça inclinada, andar em círculo, ptose palpebral e aparência rígida foram relacionadas à provável lesão acidental causada pela inserção da agulha ou por aumento da pressão hidrostática, sendo observados em aproximadamente 25% dos camundongos e dispersos aleatoriamente nos grupos. Exames macro e microscópicos nos órgãos não revelaram alterações.

Noce et al. (1994) fizeram um trabalho com camundongos, encontrando uma DL50 maior para o iopamidol e iomeprol, do que a observada no iohexol, iodixanol e iotrolan. Dos camundongos que foram a óbito (este ocorreu principalmente cinco minutos após a administração) todos apresentaram convulsões. Esticamento dos membros seguido por sedação e dispnéia foram os principais sinais observados nos animais sobreviventes, estes se recuperaram dentro de 24 horas. O exame *post-mortem* nestes animais que morreram não apresentou qualquer alteração macroscópica significativa.

Em 1996, Luzanni et al. realizaram um estudo de toxicidade aguda com injeção intracerebroventricular em camundongos e intracisternal em ratos com MC iodados monômeros (iomeprol, iopamidol, iohexol, iopentol, ioversol, iopromida) e dímeros

(iofratol, iodixanol e iotrolan), onde os sinais de toxicidade observados foram: episódios convulsivos, hipoatividade, esticamento, seguido por sedação e dispnéia. Nos camundongos todas as mortes ocorreram durante ou até 2 minutos após o término da administração. Os animais que sobreviveram se recuperaram dos sintomas em no máximo 24 horas. Os exames *post-mortem* não revelaram qualquer alteração macroscópica, exceto congestão pulmonar nos animais que receberam iopentol (4 de 14 animais) e iopromida (2 de 17 animais). Os dímeros testados foram consistentemente mais neurotóxicos do que a maior parte dos monômeros. Quando injetados intracisternalmente em ratos, os sintomas observados foram essencialmente de depressão de sistema nervoso central (sedação, dispnéia, prostração, e redução da atividade motora), com alguns episódios de convulsão. A recuperação dos sintomas ocorreu, com quase todos os meios de contraste, dentro de 24 horas. Nenhuma anormalidade foi encontrada no exame *post-mortem*. O iopentol e iopromida exibiram neurotoxicidade maior do que os demais. Diferentemente da rápida ocorrência de óbito após a administração intracerebroventricular em camundongos, as mortes após a administração intracisternal em ratos foram mais tardias, ocorrendo até 4 horas após o tratamento.

Wible et al., em 1995, fizeram um estudo comparativo entre o iohexol, iopamidol, ioversol e iopromida, com administração intracisternal em ratos. A administração do ioversol, iohexol e iopamidol não causou mortes em doses até 1000 mg I/kg. Sinais de toxicidade desses três agentes incluíram convulsões, apnéia, dispnéia e hipoatividade. Os com ioversol apresentaram tremores e vocalização. O iohexol e iopamidol também causaram hiperatividade, sendo que no primeiro foi observado também ataxia, enquanto no segundo, sensibilidade ao toque. Todos apresentavam-se normais após 24 horas de injeção. Com o iopromida na dose de 50 mg I/kg houve óbito de 4 dos 5 animais e com a dose de 100 mg I/kg, todos morreram dentro de 10 minutos após a injeção. Todos os sobreviventes ganharam peso no período de observação de 7 dias.

4.5.3 Testes neurotoxicidade com outros meios de contraste realizados em coelhos

Maly et al. (1995b), realizaram um estudo comparativo em coelhos entre o iodixanol, iopamidol e iotrolan, no qual verificaram que o iotrolan apresentou maior efeito excitatório do que o iopamidol e o iodixanol.

Sundgreen et al. (1995), compararam os efeitos intracisternais do iohexol, iodixanol e iotrolan, não encontrando efeitos excitatórios com o iohexol. Os efeitos excitatórios mais severos foram observados nos com iotrolan (convulsões generalizadas) em cinco dos dez coelhos testados. Três animais que receberam iodixanol apresentaram convulsões generalizadas dentro de 60 minutos após a injeção e um apresentou convulsão parcial. A injeção de todos os MC induziu sinais de depressão, sendo que o iohexol apresentou efeito depressivo mais acentuado do que o iodixanol e o iotrolan. Na necropsia dos coelhos com convulsão não foram observadas anormalidades macroscópicas no cérebro, ou hemorragia subaracnóide, intraventricular ou intracerebral.

Em 1995, Maly et al. realizaram uma meta-análise para avaliação comparativa de meios de contraste administrados por via intracisternal em coelhos. Dessa forma, verificaram que a metrizamida produziu efeitos severos mais depressivos do que o iohexol, iopamidol e iodixanol. O iohexol causou menos efeitos depressivos do que a metrizamida e o iopamidol, mas efeitos mais severos do que o iodixanol e iotrolan. Com relação aos efeitos excitatórios, os efeitos foram significativamente mais severos na metrizamida do que no iohexol e iopamidol. O iohexol injetado no espaço subaracnóide de 108 coelhos não produziu efeito excitatório. O iopamidol gerou efeito excitatório significativamente maior do que o iohexol, do mesmo grau que o iotrolan e iodixanol e significativamente menor do que a metrizamida.

Outro estudo realizado posteriormente por Maly et al. (1996) comparou o iohexol, iopamidol, iotrolan e iodixanol e encontrou que o iohexol não apresentou efeitos excitatórios, enquanto o iopamidol apresentou convulsões em 20% e hiperexcitabilidade em outros 40%; o iodixanol apresentou convulsões generalizadas em 20% e parciais em 40%, e o iotrolan apresentou efeitos excitatórios mais significativos, com convulsões generalizadas em mais de 50% dos animais. Efeito depressivo foi mais intenso com o iohexol do que com o iotrolan e iodixanol.

4.5.4 Testes de neurotoxicidade com outros meios de contraste realizado em cães

Estudos em cães comparando os efeitos adversos do iohexol e iopamidol (WIDMER et al., 1992) e destes com o ioversol (WILLIAN et al., 1989), não encontraram diferença estatística na ocorrência de efeitos adversos.

Com relação aos achados histopatológicos, Van Bree et al. (1991) compararam o iohexol e o iotrolan em cães necropsiados 14 dias após a administração subaracnoidea e não encontraram alterações macroscópicas nem histopatológicas. Já Sarmento et al. (2002), encontraram 14 dias após utilização do ioversol, infiltrados discretos de células inflamatórias mononucleares na fissura ventral e canal central. Esses achados foram considerados discretos e sem sinal de irritabilidade ou neurotoxicidade significativa.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 75 ratos Wistar, machos, entre três e quatro meses de idade com massa corporal média de 340 g, padrão sanitário convencional provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL).

Os animais foram alojados e mantidos individualmente durante o experimento no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), em caixas de polipropileno com dimensão de 40 x 33 x 16,5 cm forradas com maravalha limpa, sendo a limpeza e a troca das caixas realizada três vezes por semana. Foi respeitado um período de adaptação de 14 dias antes do início do experimento, com temperatura de 21°C (± 2), umidade entre 30 e 70% e com ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (das 8:30 às 20:30 horas). Os animais foram alimentados com ração comercial Nuvital CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

O alojamento, manejo, tratamento e eutanásia dos animais obedeceram às normas publicadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996), a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e o Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009.

5.2 Substâncias utilizadas na administração intracisternal

Nome comercial: Henetix[®]

Fabricante: Guerbet Produtos Radiológicos Ltda

Composição declarada na bula:

Iobitridol.....658,1000 mg

Veículo q.s.p. 1mL

Contém: cloridrato de trometamol, trometamol, edetato dissódico de cálcio diidratado e água para injeção. Equivalente a 300 mg de iodo por mL.

Registro no Ministério da Saúde 1.4980.0003

Lote: 09WC356A

Nome comercial: Omnipaque[®]

Fabricante: GE Healthcare (Shangai) Co. Ltd. Shangai, China.

Importado por: Farmasa-Laboratório Americano de Farmacoterapia S. A.

Composição declarada na bula:

Iohexol.....647 mg

Veículo q.s.p..... 1 mL

Contém: trometamol, edetato cálcico de sódio, água para injeção e ácido clorídrico. Equivalente a 300 mg de iodo por mL.

Registro no Ministério da Saúde: 1.0394.0525.002-1

Lote: 10821470

Nome comercial: Solução de Cloreto de Sódio 0,9%[®]

Fabricante: Indústria Farmacêutica Texon S. A.

Composição declarada na bula:

Cloreto de sódio.....0,9%

Água para injeção q. s. p..... 100%

Lote: 09420178, 09420180 e 0942181

5.3 Grupos experimentais

Para a realização do estudo cego, foram constituídos três grupos experimentais com 25 animais cada, sendo um grupo para cada meio de contraste (iobitridol e iohexol), e um grupo controle (NaCl 0,9%). Conforme pode ser observado na Figura 3, cada grupo foi subdividido em cinco subgrupos com cinco animais cada. Nos grupos que receberam os meios de contraste por via intracisternal, cada subgrupo recebeu uma dose distinta equivalente a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg. O grupo controle recebeu pela mesma via, solução estéril de NaCl 0,9%, em volume equivalente ao empregado nos meios de contraste testados.

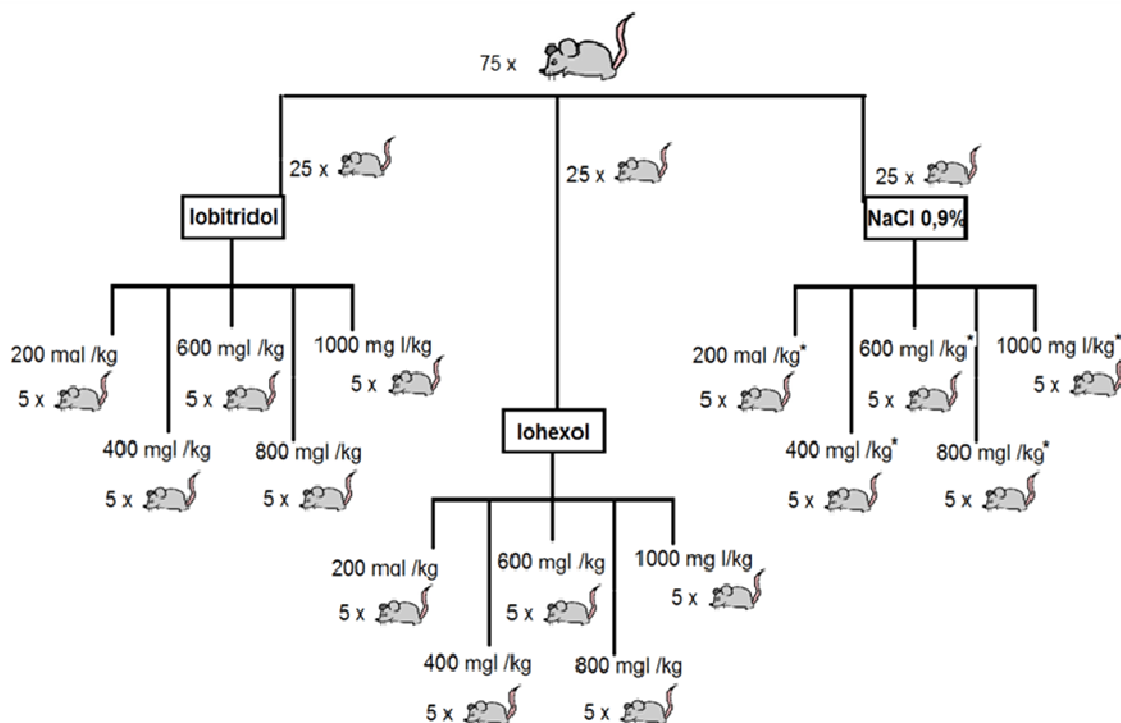


Figura 3 – Esquema da distribuição aleatória dos ratos em três grupos experimentais com 25 animais cada, sendo um grupo para cada meio de contraste, e um grupo controle. Cada grupo foi subdividido em cinco subgrupos com cinco animais cada. Nos grupos que receberam os meios de contraste por via intracisternal, cada subgrupo recebeu uma dose distinta equivalente a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg. O grupo controle recebeu pela mesma via, solução estéril de NaCl 0,9%, em volume equivalente ao empregado nos meios de contraste testados (* = volume equivalente a dose utilizada dos meios de contraste na concentração de 300mg I/mL).

5.4 Protocolo experimental

5.4.1 Preparação dos animais e anestesia.

Antes do procedimento de administração das substâncias por via intracisternal, todos os animais foram identificados, pesados, recolocados em caixas de polipropileno e levados ao Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS.

Os ratos foram submetidos à indução anestésica com isoflurano em câmara anestésica. Após verificação de que os mesmos se encontravam em plano anestésico, realizou-se tricotomia da região atlanto-occipital e posicionamento no estereotáxico com auxílio das barras auriculares, mantendo o ângulo entre a cabeça e o corpo em 90° , o que permitiu que a superfície puncionada ficasse posicionada horizontalmente. Para que essa angulação fosse obtida, e o correto posicionamento do animal fosse alcançado, foi colocado embaixo do animal uma base de madeira, que permitia que as barras auriculares ficassem suspensas a uma distância de 52 mm da base do corpo do rato, e a parte dorsal da cabeça do rato foi fixada com a barra de fixação em um ângulo de 110° em relação à superfície horizontal (Figura 4). A anestesia foi mantida com isoflurano através de máscara e a antissepsia do local tricotomizado foi realizada com álcool iodado 70% (Figura 5).

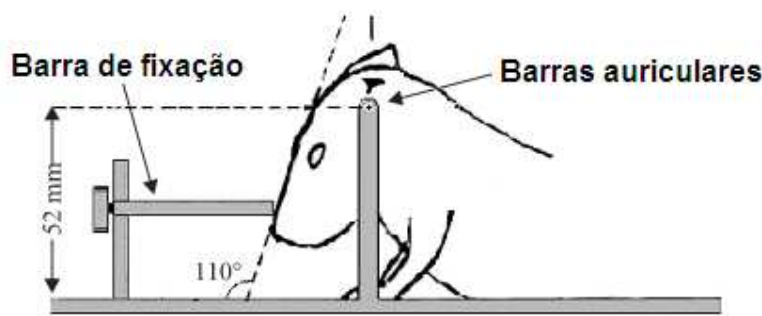


Figura 4 – Posicionamento do rato no estereotáxico, com as barras auriculares suspensas a uma distância de 52 mm da base do rato, e a parte dorsal da cabeça do rato fixada com a barra de fixação em um ângulo de 110° com relação à superfície horizontal, permitindo a correta introdução da agulha.

Nota: adaptado de Lebedev et al., 2004.

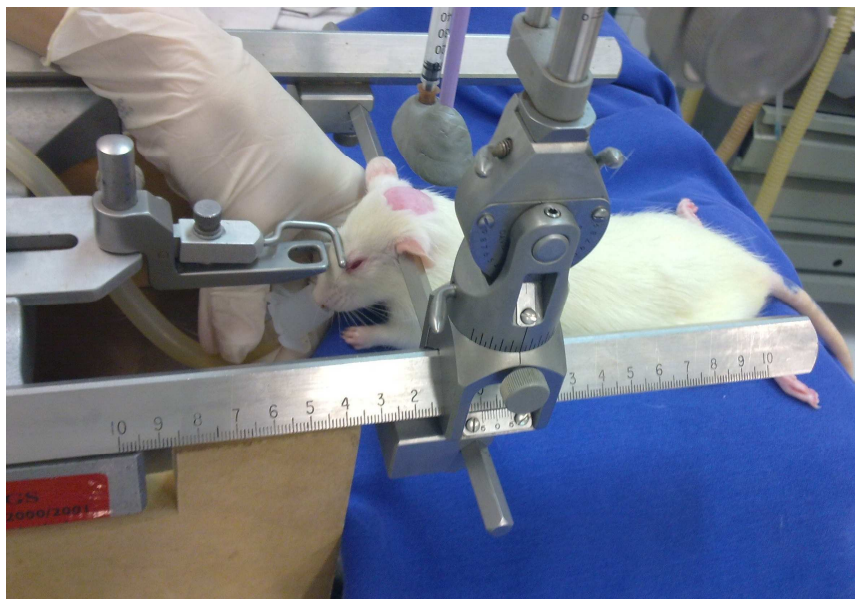


Figura 5 – Rato após indução anestésica e tricotomia da região cervical, preso no estereotáxico através das barras auriculares e mantido com isoflurano através de máscara.

5.4.2 Identificação do local a ser puncionado

Após prévia palpação entre o osso parietal e a coluna vertebral, uma pinça hemostática foi utilizada para determinar o ponto mais móvel nessa superfície (ponto médio entre o occipital e o atlas, na linha média) (Figura 6). O lugar puncionado foi determinado a partir do ponto médio sendo realizado 1 mm cranial à este. A agulha introduzida apresentava calibre de 0,45 x 13, previamente colocada na torre dorsal acoplada a uma seringa de 1 mL. A agulha foi introduzida com a profundidade de 5,5 a 6,5 mm de acordo com a massa corporal (conforme dados de Lebedev 2004). A introdução da agulha foi baseada nas características espaciais da Figura 7, sendo a correta profundidade verificada pelo efluxo de fluido cerebrospinal translúcido (Figura 8). Nos casos onde não houve efluxo de fluido cerebrospinal, na posição inicial de 5,5 mm nos ratos até 250 g, e 6 mm naqueles com mais de 250 g, a agulha era introduzida de 0,2 em 0,2 mm até que o mesmo fosse observado.



Figura 6 – Rato anestesiado com isoflurano, preso no aparelho de estereotaxia com auxílio das barras auriculares, com a correta ventroflexão da cabeça. Após antissepsia com álcool iodado, determinação do ponto mais móvel entre o osso parietal e coluna vertebral no rato Wistar, para determinação do local de introdução da agulha.

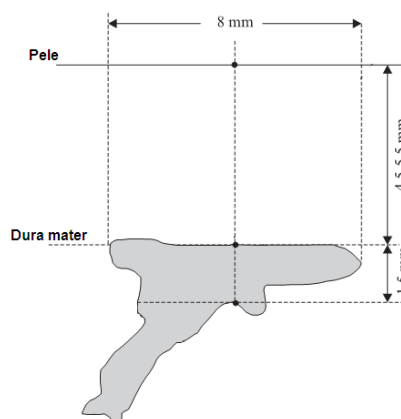


Figura 7 – Características espaciais da cisterna cerebral de ratos Wistar. Distância no ponto médio entre o osso parietal e coluna vertebral, da pele até a dura mater varia de 4,5 a 5,5 mm, conforme peso do animal.

Nota: adaptado de Lebedev et al., 2004.



Figura 8 – Rato corretamente posicionado no aparelho de estereotaxia, com ventroflexão da cabeça. Após introdução da agulha, confirmação do ponto correto através do efluxo de fluido cerebrospinal translúcido.

5.4.3 Administração das substâncias e realização das radiografias

Após a retirada de 0,04 a 0,06 mL de liquor, foi acoplada uma nova seringa previamente preenchida com o volume da substância a ser utilizada, isto é; iobitridol, iohexol e NaCl 0,9%, todas pré-aquecidas em banho-maria à 37°C antes da aplicação (Figura 9).

A velocidade de administração manual foi de aproximadamente 0,05 mL/segundo.

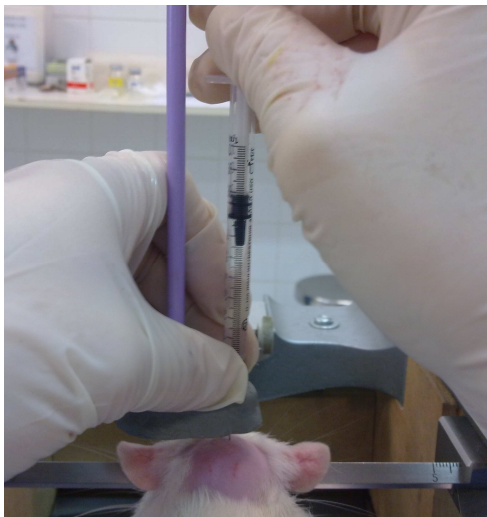


Figura 9 – Rato no aparelho de estereotaxia, preso com as barras auriculares. Após a troca da seringa, por uma previamente preenchida com o volume de substância a ser utilizada, foi realizada a administração da mesma via intracisternal.

Após a administração os animais foram mantidos na mesma posição por um minuto sem a retirada da agulha. Transcorrido esse tempo, eles foram retirados do estereotáxico e mantidos por mais um minuto com compressão digital no local da aplicação (Figura 10). Ao término deste período foram realizadas radiografias nos animais para verificação da presença do meio de contraste no espaço subaracnóide (Figura 11), e em seguida os animais foram recolocados em caixas, deixando-os moverem-se livremente.

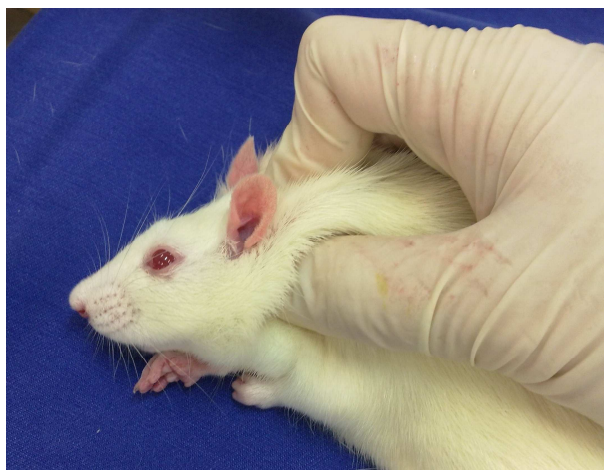


Figura 10 – Compressão manual no local da injeção por um minuto antes da realização das radiografias.



Figura 11 – Radiografia da região cervical do rato, realizada dois minutos após término da administração de meio de contraste iodado no espaço subaracnoide, onde se verifica a correta localização do mesmo.

5.4.4 Avaliações clínicas

Os animais foram avaliados quanto a sinais de excitação, depressão e reflexos nos tempos 5, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após o término da injeção, e; posteriormente uma vez ao dia durante sete dias. Sinais de alteração do trato respiratório também foram avaliados, tanto no momento do procedimento, quanto posteriormente nos tempos acima citados. A massa corporal, ingestão de água e de ração foram mensurados diariamente a partir do dia do procedimento, por sete dias.

Os sinais de excitação e depressão foram pontuados conforme descrito na Tabela 2, onde os sinais de excitação foram mensurados através da observação do estado de alerta e padrão de locomoção, e os de depressão através da presença de movimentos involuntários, tais como convulsões, e sinais de aumento de responsividade.

Tabela 2- Avaliação, por pontuação, dos ratos submetidos à aplicação intracisternal de iobitridol, iohexol e NaCl 0,9%, conforme sinais de excitação (estado de alerta e padrão de locomoção), e de depressão (presença de movimentos involuntários e sinais de aumento de responsividade).

	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Depressão	Rato cheirando, sentando espontaneamente e com responsividade	Desorientação e/ou apatia e/ou lentidão dos movimentos.	Imóvel, mas responsivo ao toque.	Paresia e/ou imóvel e irresponsivo.
Excitação	normal ao toque. Sem sinal de alteração.	Irritabilidade e/ou hiperreflexia.	Convulsões parciais.	Convulsões generalizadas.

Nota: adaptado de Sovak et al., 1980; Sundgreen et al., 1995; Maly et al., 1995b.

Também foram avaliados os reflexos: tátil de agarramento palmar, flexor, extensor, palpebral, pupilar e da pina, reação de endireitamento e posicionamento e resposta auditiva, conforme dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Descrição da forma de avaliação, para identificação de respostas normais dos reflexos, reação de endireitamento e posicionamento, e teste auditivo.

<i>Parâmetro Avaliado</i>	<i>Descrição do teste</i>	<i>Normal</i>	<i>Alterado</i>	
Reflexos	Tátil de agarramento palmar	Permite-se que o rato encoste em uma grade com os membros anteriores e se exerce tração na base da cauda caudalmente para avaliar a força de agarramento.	Força de agarramento normal.	Força de agarramento pobre ou ausente.
	Flexor	Segura-se o rato pelo tórax na porção dorsal e aperta-se os dedos do mesmo.	Flexão do membro.	Ausência de flexão.
	Extensor	Segura-se o rato pelo tórax na porção dorsal, pressiona-se a superfície plantar de um dos dígitos dos membros posteriores.	Extensão do membro.	Ausência de extensão.
	Palpebral	Leve toque no canto medial e observa-se o fechamento palpebral.	Fechamento palpebral completo.	Fechamento palpebral reduzido a ausente.

Pupilar direto	Ilumina-se os olhos com auxílio de lanterna.	Constrição presente.	Constrição ausente.
Pina	Leve toque na superfície interna da pina com fio de nylon.	Presença de movimento da orelha após o teste.	Ausência de movimento da orelha.
Reação de endireitamento	Rato é colocado de costas em uma superfície horizontal.	Resposta normal, isto é, ele se vira imediatamente e fica em posição quadrípedal.	Resposta demorada (maior do que 1 segundo).
Reação de posicionamento	Segura-se o rato pela base da cauda e o desloca em direção à superfície horizontal (p. ex.: mesa).	Quando a vibrissa toca essa superfície, a resposta normal é a extensão do pescoço, tronco e membros anteriores.	Resposta reduzida a ausente.
Teste auditivo	Estala-se os dedos.	Reação de hesitação após o estalar de dedos.	Ausência de hesitação após estalar de dedos.

Nota: adaptado de Sovak et al., 1980; Ross, 2000; Ross, 2002.

Com relação ao trato respiratório, foram avaliados sinais de alteração do padrão respiratório, como dispnéia, bradipnéia e apnéia, e presença ou não de secreção nasal durante e após a aplicação da substância. Quaisquer outras alterações observadas com o animal na caixa e à manipulação, como presença de estereotipia (sequência invariável ou repetitiva de movimentos ou gestos específicos) ou alterações de marcha como ataxia ou retropulsão (movimento persistente de locomoção para trás ou movimentos súbitos e forçados com os membros posteriores) também foram registrados.

5.5 Eutanásia e necropsia

Para a realização da necropsia, os ratos foram submetidos à eutanásia, respeitando as normas do COBEA e legislação vigente, em câmara de CO₂ e posteriormente posicionados em decúbito ventral com flexão ventral da cabeça de 90°. Realizou-se incisão da pele na região atlanto-occipital, divulsão dos músculos para permitir perfuração da membrana atlanto-occipital com posterior dissecação e remoção do cérebro, cerebelo, medula espinhal cervical, torácica e lombar com auxílio de alicate. Os órgãos foram analisados macroscopicamente, e caso houvesse alterações estas seriam registradas. Aleatoriamente, dois animais por subgrupo foram fixados em formol 10%, os órgãos coletados foram submetidos aos processos rotineiros de preparação, passando por uma série gradativa de soluções alcoólicas até 100% e acrescidos de parafina derretida até seu resfriamento e endurecimento. A parafina foi aparada em forma de bloco e cortada em fatias pelo micrótomo. Esses cortes foram lavados com xilol para remover a parafina e corados com hematoxilina e eosina, segundo técnica de *Ross et al.* (1989), sendo realizadas três lâminas de histologia para cada órgão coletado. Os exames histopatológicos foram realizados no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS.

5.6 Análise estatística

A metodologia utilizada na análise estatística incluiu os testes de Qui-quadrado exato de Fischer e análise de variância (ANOVA). Para avaliar a associação entre as doses e as variáveis, e o fármaco e as variáveis foi utilizado o teste de Qui-quadrado exato de Fischer. Para as variáveis quantitativas referentes à influência das diferentes

substâncias e doses testadas sobre a massa corporal, ingestões de água e de ração, foram utilizadas análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas.

Todas as variáveis citadas respeitaram os valores estatisticamente significativos, com uma confiança de 95% ($p < 0,05$). Os programas utilizados para efetuar essa análise foram o SpSS 18 e o EXCEL.

6. RESULTADOS

6.1 Sinais de depressão e excitação.

6.1.1 Sinais de depressão

A Figura 12 apresenta os sinais de depressão observados no comportamento dos ratos a partir de 5 minutos da aplicação da substância (iohexol, iobitridol ou NaCl 0,9%) por via intracisternal em cinco doses diferentes, equivalentes a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg no caso dos meios de contraste, e o volume equivalente de NaCl 0,9%.

Não houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros avaliados para verificação de sinais de depressão entre as doses e os fármacos ($p > 0,05$).

Todos os animais que apresentaram sinal de depressão na avaliação depois de 1 hora após a administração da substância, apresentaram outros sinais neurológicos, como inclinação da cabeça, andar em círculos e ataxia.

6.1.2 Sinais de excitação

A Figura 13 mostra os sinais de excitação observados no comportamento dos ratos a partir de 5 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, iobitridol, NaCl 0,9%), por via intracisternal em cinco doses diferentes, equivalentes a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg no caso dos meios de contraste e o volume equivalente de NaCl 0,9%. Independente do tempo de avaliação, todos os animais permaneceram em observação nas 4 horas seguintes à administração da substância para verificar a presença de qualquer episódio convulsivo. Nenhum animal apresentou convulsão fora dos tempos pré-determinados

Houve apenas dois casos de convulsão: uma total, ocorrendo em um animal do grupo iohexol na dose 400 mg I /kg, enquanto a outra foi parcial, acometendo apenas os músculos da face, com o iobitridol na máxima dose testada.

Verificou-se ausência de diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as doses e os fármacos testados com relação aos sinais de excitação avaliados.

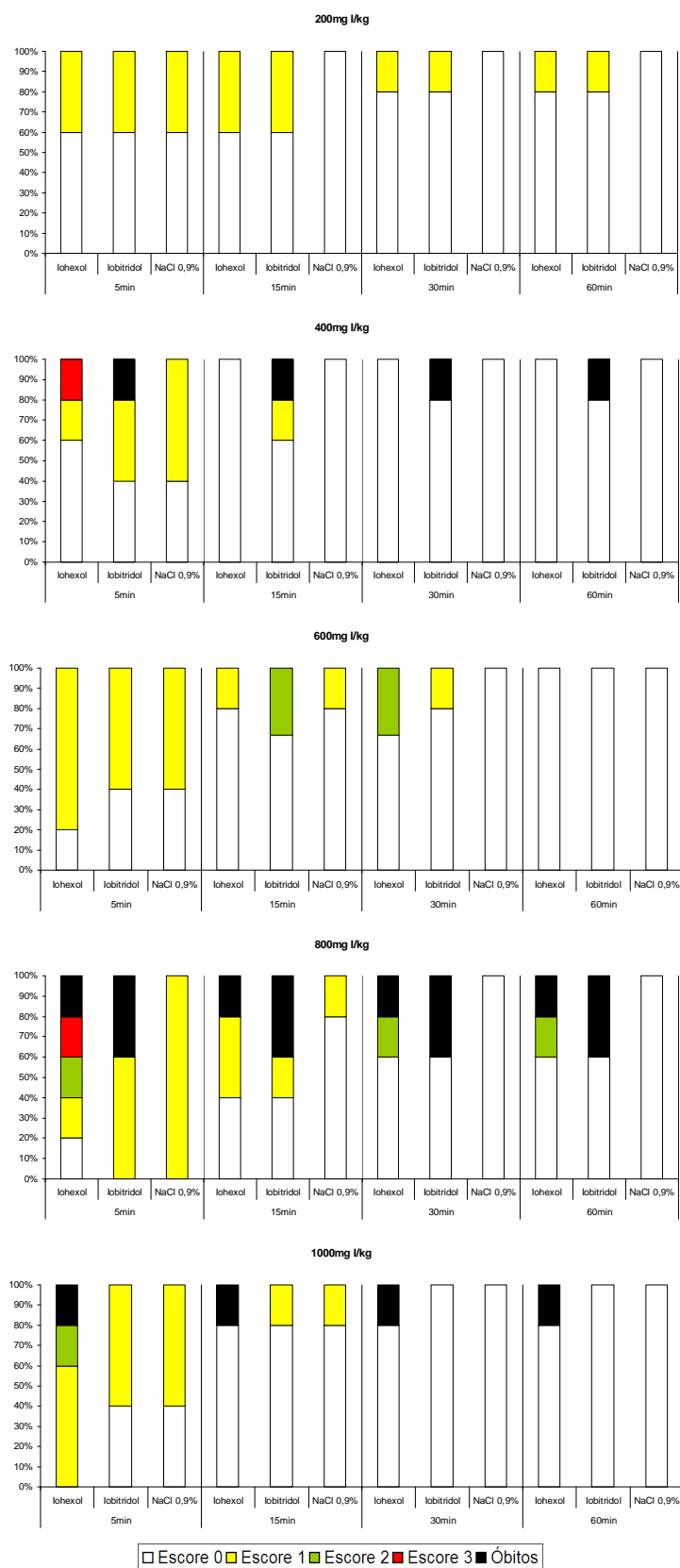


Figura 12 – Sinais de depressão no comportamento dos ratos de 5 a 60 minutos do término da aplicação da substância (iohexol,lobitridol e NaCl 0,9%) por via intracisterna. Em cima das tabelas constam as doses diferentes e ao volume correspondente de NaCl 0,9%. Escore 0 = rato cheirando, sentando espontaneamente e com responsividade normal ao toque. Escore 1 = desorientação e/ou apatia e/ou lentidão dos movimentos. Escore 2 = imóvel, mas responsivo ao toque. Escore 3 = parestia e/ou imóvel e irresponsivo.

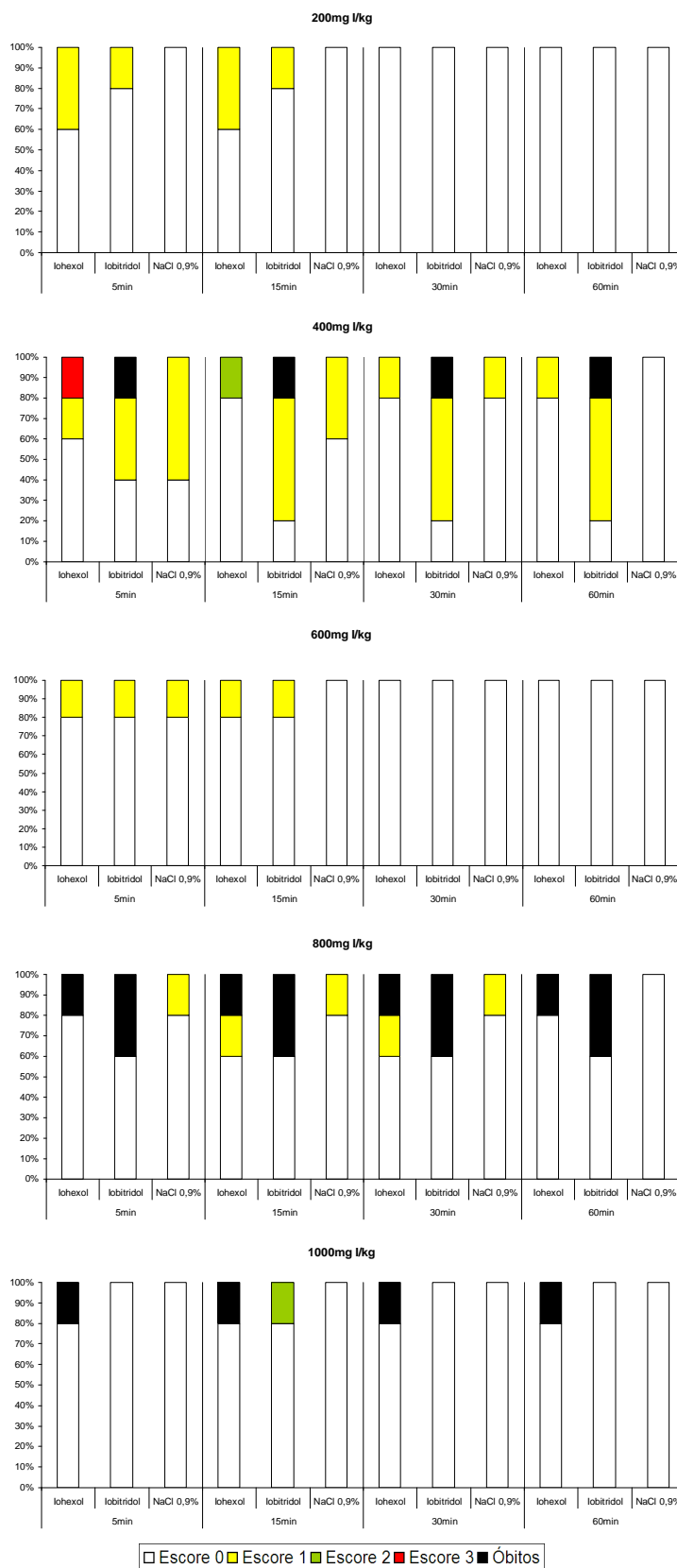


Figura 13 – Sinais de excitação no comportamento dos ratos de 5 a 60 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, lobitridol e NaCl 0,9%) por via intracisternal. Em cima das tabelas constam as doses diferentes e ao volume correspondente de NaCl 0,9%. Escore 0 = rato cheirando, sentando espontaneamente e com responsividade normal ao toque. Escore 1 = irritabilidade e/ou hiperreflexia. Escore 2 = convulsões parciais. Escore 3 = convulsões generalizadas.

6.2 Óbitos e alterações no trato respiratório

6.2.1 Óbitos

Tanto na Figura 12, quanto na Figura 13, constam os óbitos observados durante o experimento. Todos ocorreram após quadro de apnéia, durante ou até 2 minutos após o término da aplicação da substância testada. Ocorreu óbito em cinco animais no total, dois pertencentes ao grupo iohexol e três do grupo iobitridol.

Não houve diferença estatisticamente significativa a 5% entre o número de mortes em cada grupo e nem em relação às doses pelo teste de Qui-quadrado exato de Fischer.

6.2.2 Alteração no padrão respiratório

A Figura 14 apresenta o percentual do número de animais com sinais de alteração no padrão respiratório, com algum sinal de bradipnéia durante a aplicação da substância (iohexol, iobitridol ou NaCl 0,9%), por via intracisternal em cinco doses diferentes, equivalentes a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg no caso dos meios de contraste e ao volume equivalente de NaCl 0,9%. Todos os casos ocorreram no momento da aplicação, persistindo por cinco minutos após a aplicação em dois animais do iohexol (400 e 800 mg I/kg), um do iobitridol (200 mg I/kg) e um do NaCl 0,9% (equivalente a 400 mg I/kg); e por 30 minutos em um do iobitridol (400 mg I/kg) e do NaCl 0,9% (equivalente a 1000 mg I/kg).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

6.2.3 Secreção nasal

Secreção nasal foi observada em 48 dos ratos testados, conforme consta na Figura 14, ocorrendo durante ou imediatamente após a aplicação da substância testada.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as doses e as substâncias utilizadas ($p > 0,05$).

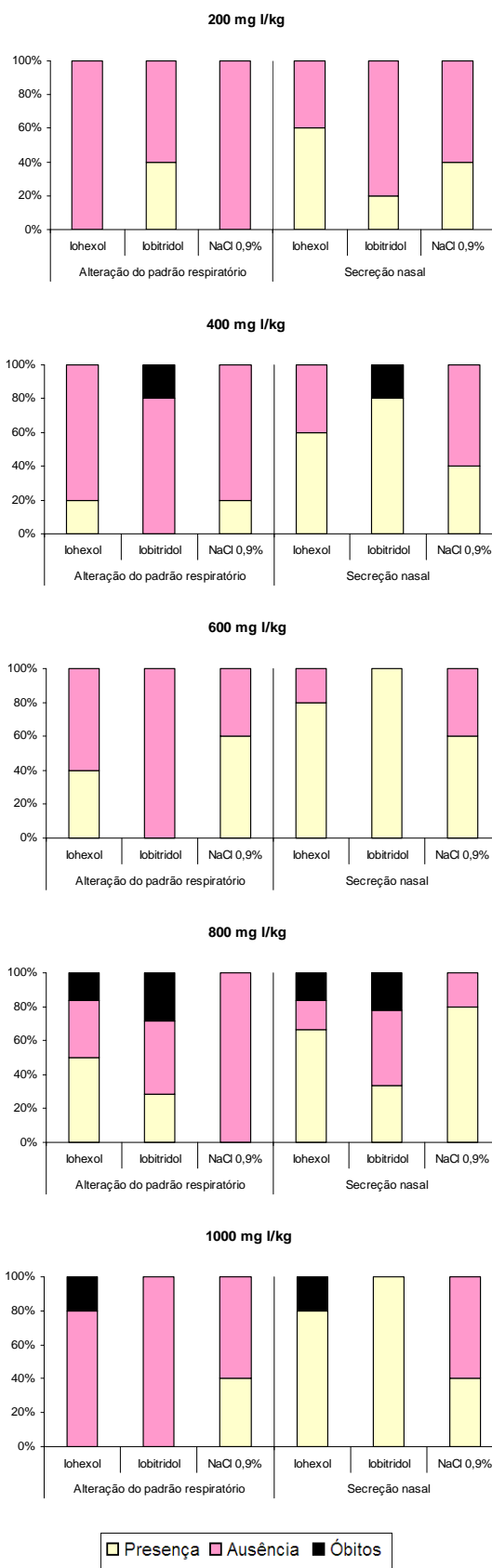


Figura 14 – Frequência de animais com sinais de alteração no padrão respiratório e presença de secreção nasal, durante e logo após a aplicação da substância (iohexol, iobitridol, NaCl 0,9%) por via intracisternal. Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9%.

6.3 Teste dos reflexos, reações e resposta auditiva

6.3.1 Teste dos reflexos tátil de agarramento palmar, flexor e extensor

No Figura 15 constam o número de animais com os reflexos normais de agarramento, flexor e extensor a partir de 5 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, iobitridol ou NaCl 0,9%) por via intracisternal, em cinco doses diferentes, equivalentes a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg no caso dos meios de contraste e o volume equivalente de NaCl 0,9%.

Todas as ausências de reflexo foram observadas na primeira avaliação, 5 minutos após o procedimento. Nenhum dos animais com déficits dos reflexos flexor ou extensor apresentou sinais de alteração em avaliações posteriores. Com relação ao reflexo de agarramento, os sinais persistiram em um dos animais, do grupo iohexol 800 mg I/kg até 24 horas após o procedimento.

Verificou-se ausência de diferença estatisticamente significativa na resposta dos reflexos entre as doses e os fármacos.

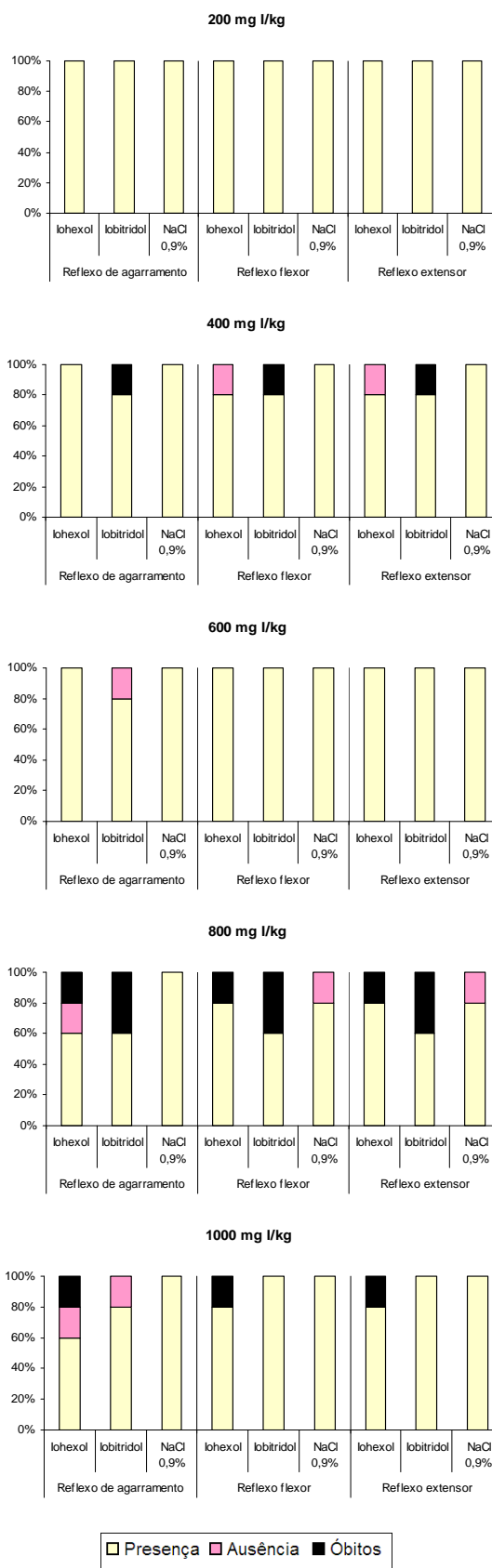


Figura 15 – Freqüência de animais com os reflexos presentes e ausentes de agarramento, flexor e extensor após 5 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, iobitridol ou NaCl 0,9%) por via intracisterna. Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI/kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9%.

6.3.2 Testes dos reflexos palpebral, pupilar e da pina

A Figura 16 mostra o número de animais com os reflexos palpebral, pupilar e da pina normais a partir de 5 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, iobitridol ou NaCl 0,9%) por via intracisternal, com cinco doses diferentes, equivalentes a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg no caso dos meios de contraste e o volume equivalente de NaCl 0,9%.

Dentre os animais avaliados, como se pode observar na Figura 16, 26 apresentaram alteração do reflexo palpebral, enquanto somente um foi acometido com alteração do reflexo pupilar e dois com o da pina. O reflexo palpebral foi o único reflexo que persistiu ausente em alguns animais por mais do que 24 horas, com dois casos perdurando por três dias; envolvendo um animal do grupo iohexol (600 mg I/kg) e outro do iobitridol (1000 mg I/kg).

Já no caso do reflexo pupilar, este apresentava-se normal 15 minutos após a aplicação, e tratava-se de um animal do grupo iohexol 400 mg I/kg, enquanto o da pina envolveu um animal do grupo iobitridol 800 mg I/kg e outro do controle equivalente a 800 mg I/kg, sendo que o reflexo já apresentava-se normal na avaliação 30 e 15 minutos, respectivamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa na resposta entre as doses e os fármacos relacionada à alteração dos reflexos ($p > 0,05$), exceto em relação ao reflexo palpebral, com a dose de 200 mg I/kg se comparada às demais doses, havendo uma tendência de redução deste reflexo com o aumento da dose.

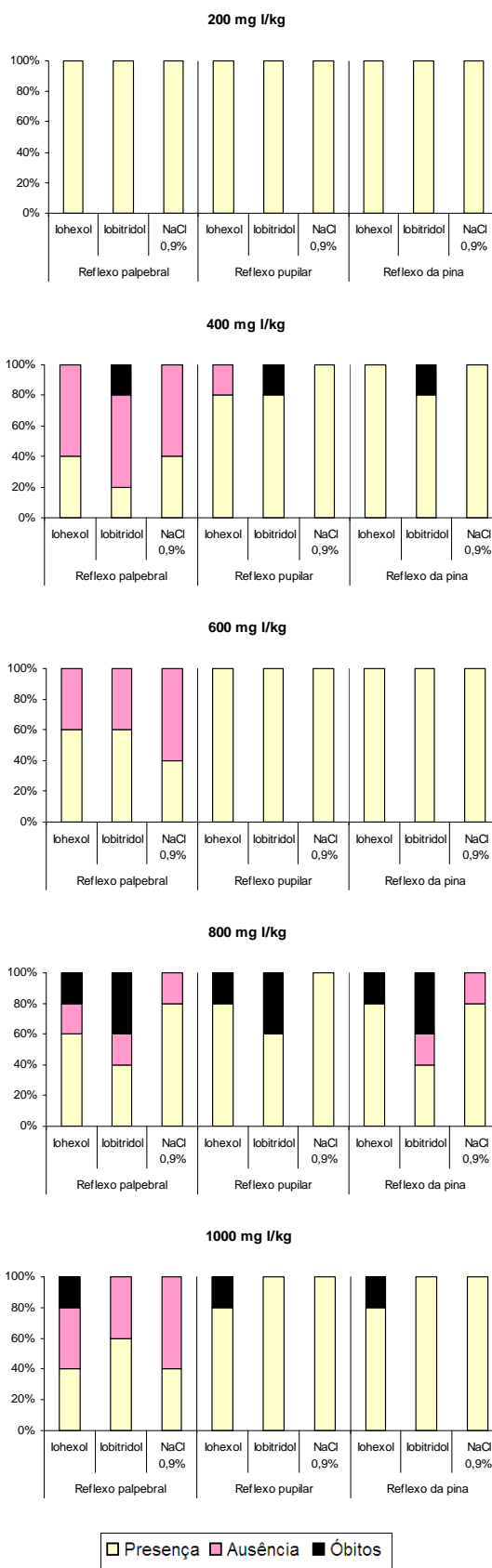


Figura 16 – Frequência de animais com os reflexos palpebral, pupilar e da pina presentes e ausentes após 5 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, iobitridol ou NaCl 0,9%) por via intracisternal. Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI /kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9%.

6.3.3 Teste da reação de endireitamento, posicionamento e resposta auditiva

Na Figura 17 constam o número de animais com reação de endireitamento e posicionamento, e resposta auditiva normais a partir de 5 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, iobitridol ou NaCl 0,9%) por via intracisternal, com utilização de cinco doses diferentes, equivalentes a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg no caso dos meios de contraste e o volume equivalente de NaCl 0,9%.

Nenhum animal apresentou ausência na reação de endireitamento nos tempos observados. Todas as respostas alteradas referentes ao teste de posicionamento e resposta auditiva foram observadas 5 minutos após a administração da substância, excetuando-se um animal do grupo iobitridol 600mg I/kg, em que os sinais de deficiência na resposta auditiva ocorreram a partir de 60 minutos, persistindo por até pelo menos quatro horas. No grupo iohexol, houve deficiência na resposta auditiva por pelo menos 15 minutos em um animal da dose 400 mg I/kg e 1000 mg I/kg, e; por no mínimo 2 horas em um da dose 600 mg I/kg.

A ausência da reação de posicionamento pôde ser observada em um animal até 30 minutos após a administração da substância, no grupo iobitridol 600 mg I/kg e no controle (equivalente a 800 mg I/kg).

Esses testes foram também foram realizados nos sete dias subseqüentes, não sendo observadas alterações nesses momentos.

Verificou-se ausência de diferença estatisticamente significativa na resposta entre as doses e os fármacos ($p > 0,05$).

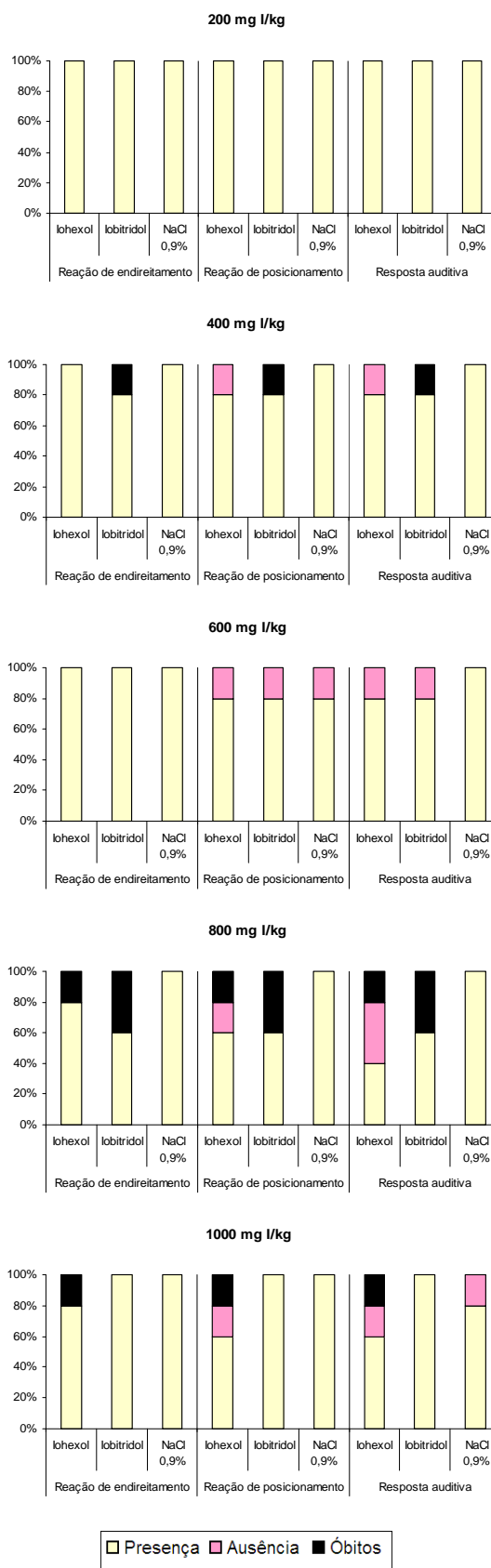


Figura 17 – Frequência de animais com os reação de endireitamento, reação de posicionamento e resposta auditiva presentes e ausentes após 5 minutos do término da aplicação da substância (iohexol, iobitridol, NaCl 0,9%) por via intracisternal. Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9%.

6.3.4 Outras alterações neurológicas observadas

Dentre os animais tratados com o iohexol, houve quatro animais com outro tipo de alteração neurológica, cada qual com uma dose diferente:

- 200 mg I/kg – inclinação da cabeça para o lado direito, sendo observado uma hora após o procedimento e persistindo até pelo menos três horas depois

- 400 mg I/kg – *grooming* por pelo menos dois minutos ininterruptamente 15 minutos após a aplicação.

- 600 mg I/kg – retropulsão, com movimentos súbitos dos membros posteriores

- 800 mg I/kg – ataxia iniciada uma hora após a aplicação e persistindo por pelo menos três horas. Quatro horas após o procedimento, se verificou que o animal tinha sinais de retropulsão, andando para trás. Esse sinal persistiu até o terceiro dia de avaliação.

Dos tratados com iobitridol, apenas dois animais apresentaram outro tipo de alteração:

- 600 mg I/kg passando as patas dianteiras na face e com as mãos juntas sem apreensão da grade 15 minutos após o procedimento.

- 1000 mg I/kg cabeça virada para o lado direito também 15 minutos após o procedimento.

No grupo controle foi observado ataxia em um animal com volume equivalente a 800 mg I/kg desde 15 minutos após o procedimento, até pelo menos 4 horas, não sendo observado 24 horas depois.

7.4 Massa corporal e consumo de ração e água (%)

7.4.1 Massa corporal

A Figura 18 mostra a variação na massa corporal percentual (%) dos animais em relação ao dia do procedimento de aplicação da substância (iohexol, iobitridol ou NaCl 0,9%) por via intracisternal, em cinco doses diferentes, equivalentes a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg no caso dos meios de contraste e o volume equivalente de NaCl 0,9%.

Verificou-se ausência de diferença estatisticamente significativa entre as doses e os fármacos ($p > 0,05$).

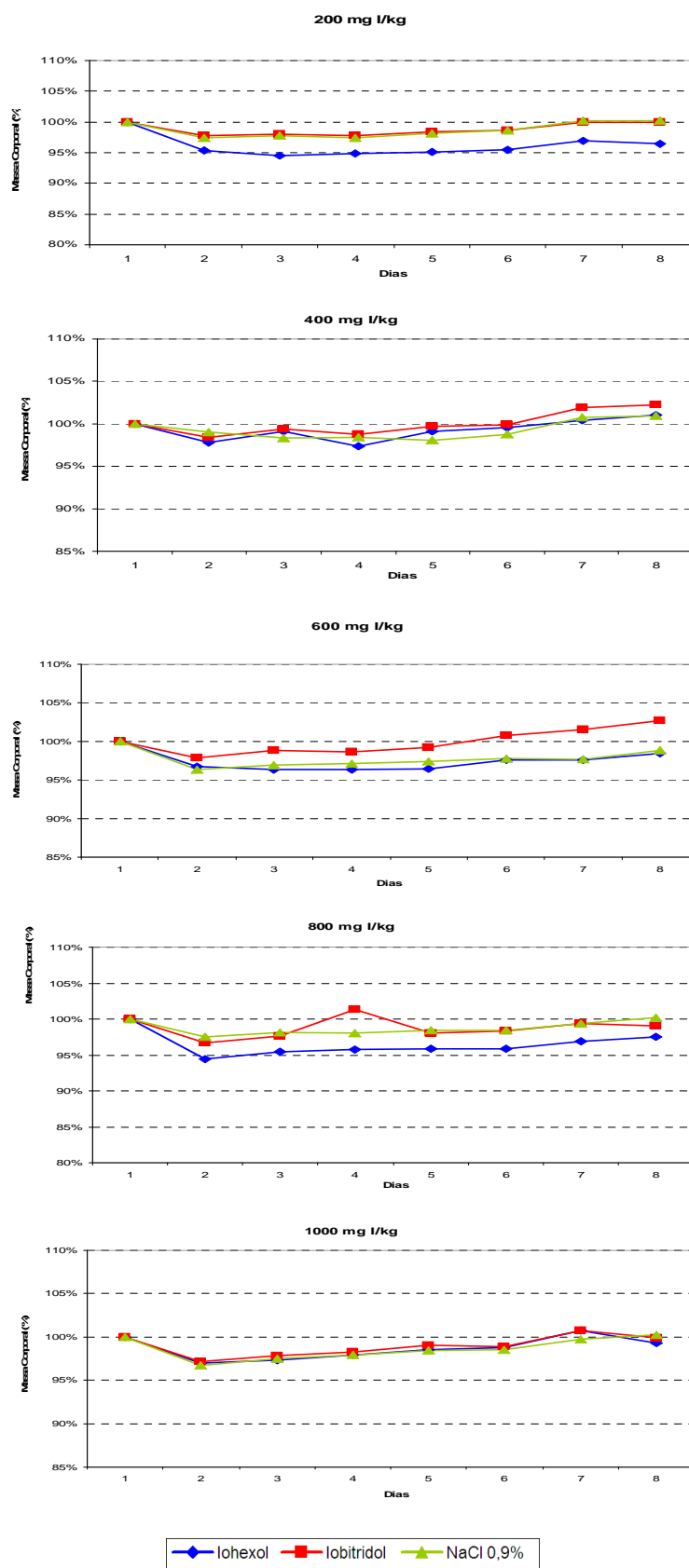


Figura 18 – Variação da massa corporal percentual (%) dos animais nos dias subsequentes à aplicação da substância (iohexol, iobitridol ou NaCl 0,9% por via intracisternal), em comparação ao dia 0. Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9% (n= 5 animais por grupo).

7.4.2 Consumo percentual de ração (%)

A Figura 19 mostra o consumo de ração percentual (%) em relação a massa corporal dos animais após o procedimento de aplicação da substância (iohexol, iobitridol, NaCl 0,9%) por via intracisternal, em cinco doses diferentes, equivalentes a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg no caso dos meios de contraste e o volume equivalente de NaCl 0,9%. O cálculo foi efetuado a partir do consumo diário de ração (g), relacionado à massa corporal diária (g).

Verificou-se ausência de diferença estatisticamente significativa entre as doses e os fármacos ($p > 0,05$).

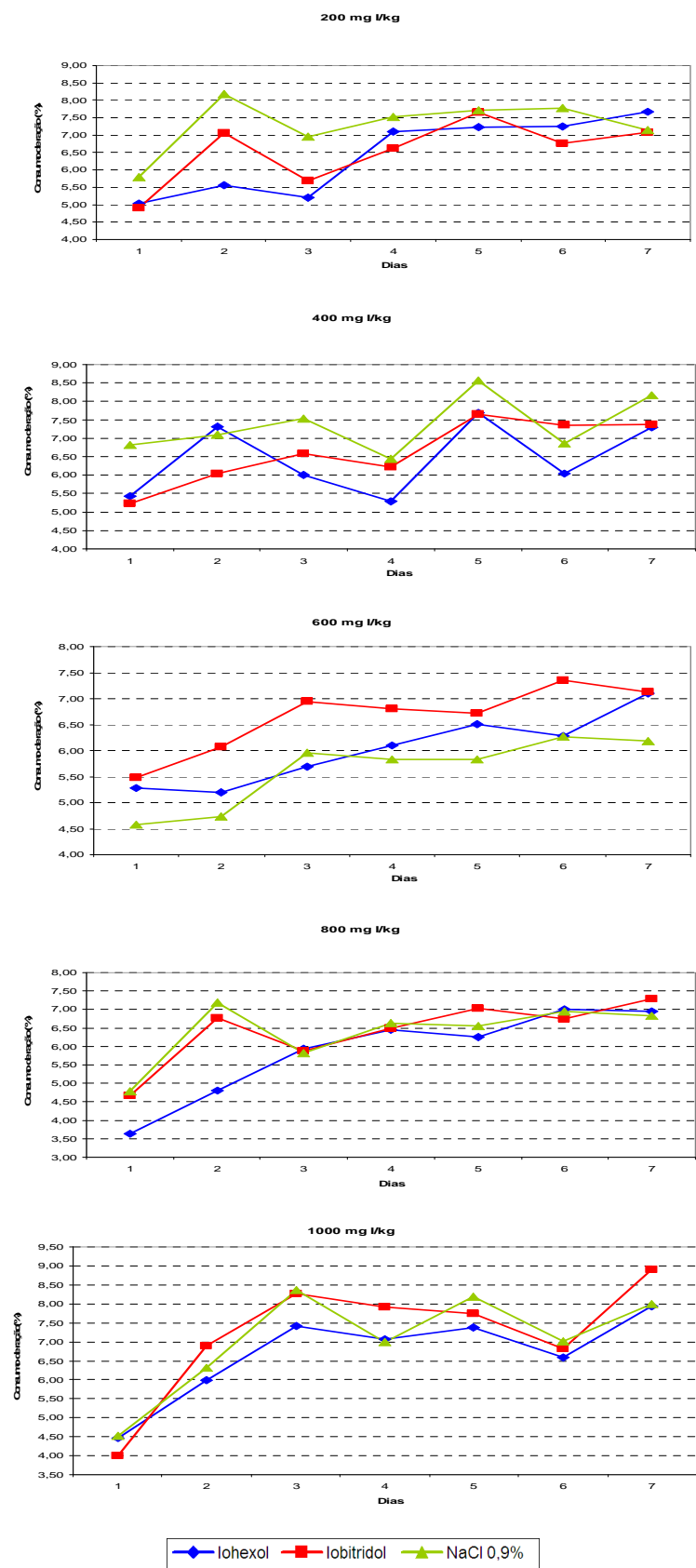


Figura 19 – Variação no consumo percentual de ração (%) em relação à massa corporal dos animais nos sete dias subseqüentes à aplicação da substância (iohexol, iobitridol e NaCl 0,9% por via intracisternal). Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI /kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9% (n= 5 animais por grupo).

7.4.3 Consumo percentual de água (%)

A Figura 20 mostra o consumo de água percentual (%) em relação a massa corporal dos animais após o procedimento de aplicação da substância (iohexol, iobitridol, NaCl 0,9%) por via intracisternal, em cinco doses diferentes, equivalentes a 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg no caso dos meios de contraste e o volume equivalente de NaCl 0,9%. O cálculo foi efetuado a partir da ingestão diária de água (mL), relacionado à massa corporal diária (g).

Verificou-se ausência de diferença estatisticamente significativa entre as doses e os fármacos ($p > 0,05$).

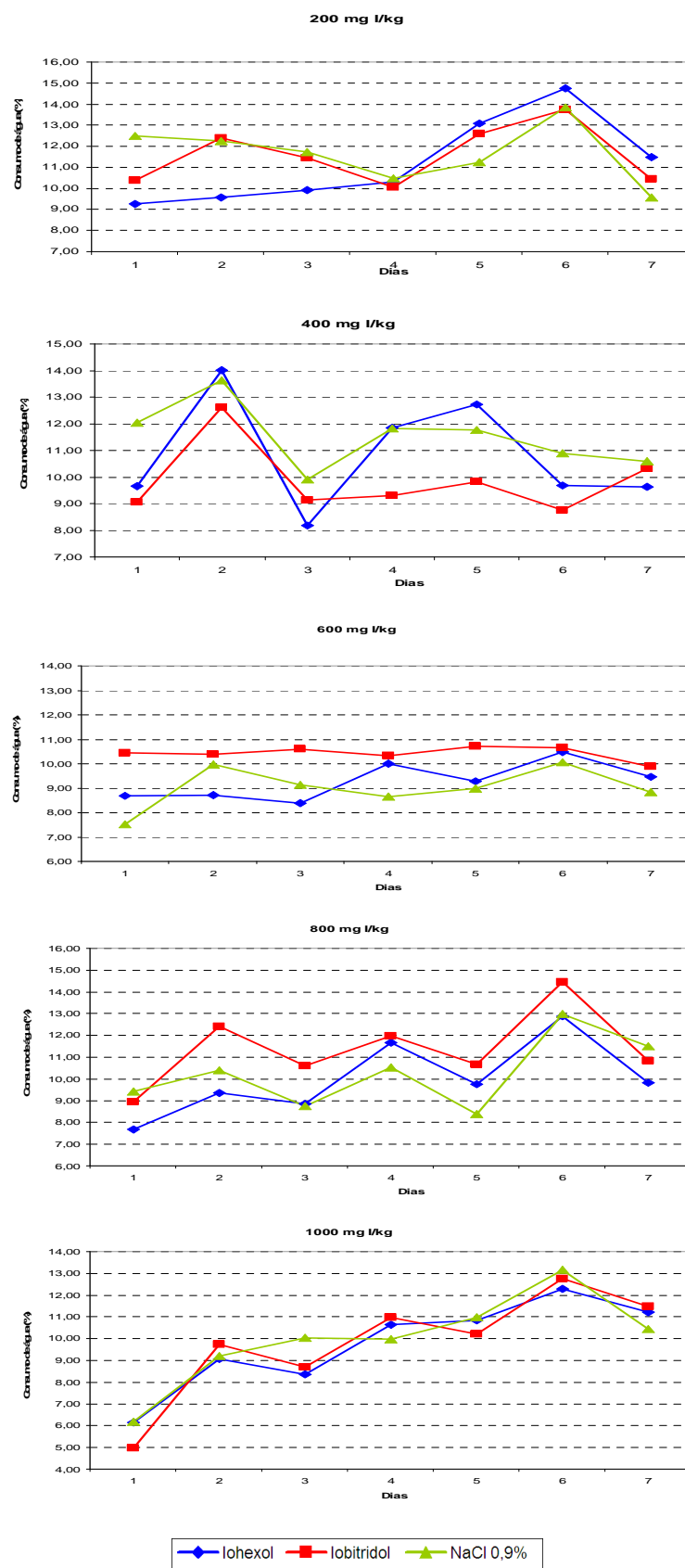


Figura 20 – Variação no consumo percentual de água (%) em relação à massa corporal dos animais nos sete dias subseqüentes à aplicação da substância (iohexol, iobitridol e NaCl 0,9% por via intracisternal). Doses de 200, 400, 600, 800 e 1000 mgI /kg, nos casos dos meios de contraste, e ao volume correspondente de NaCl 0,9% (n= 5 animais por grupo).

7.5 Achados de necropsia e análise histopatológica

A avaliação macroscópica do cérebro, cerebelo, medula espinhal cervical, torácica e lombar não revelaram quaisquer alterações morfológicas que pudessem indicar sinais de alteração, mesmo naqueles animais em que o óbito ocorreu durante a realização do procedimento, conforme pode ser observado na Figura 21.

A análise histopatológica destes mesmos órgãos, realizada tanto nos animais eutanasiados, quanto naqueles que foram a óbito durante o procedimento, não revelou sinais de alteração circulatória, inflamatória, degenerativa ou necrótica.



Figura 21 – Necropsia de um dos ratos do experimento, que foi a óbito durante o procedimento, não havendo sinais de alteração macroscópica.

8. DISCUSSÃO

Por razões éticas e por não haver na literatura nenhum experimento estabelecendo a DL50 do iobitridol por via IC em ratos, as substâncias foram testadas em apenas cinco animais por dose, sendo utilizadas da menor para a maior dose, e caso os cinco animais de uma dose em particular morressem antes de alcançar 1000 mg I/kg, essa seria a última dose utilizada. Esse mesmo padrão de utilização em doses crescentes com 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg foi antes realizado com MC iodados por Wible et al., 1995, onde este pôde determinar a dose letal da iopromida.

Testes de neurotoxicidade aguda podem ser utilizados para avaliar uma série de efeitos incluindo: estimulação e depressão do SNC, perturbação de reflexos, dano aos nervos periféricos, efeitos cognitivos no aprendizado e memória, efeitos na atividade motora e alterações neuropatológicas. Quando realizados em ratos, esses testes incluem avaliação através da bateria de observação funcional, conhecida como FOB (criada pelo Agência Protetora do Meio Ambiente dos Estados Unidos para mensuração quantitativa e qualitativa de alterações clínicas de agentes neurotóxicos.), e neuropatologia (HAM, et al., 2006; HODGSON; CUNNY, 2010). A FOB engloba avaliações: neuromusculares, como observações de marcha, endireitamento e agarramento; hiperexcitabilidade, com observação de movimentos tônicos e clônicos; fisiológicas, como através da mensuração de peso; reatividade sensoriomotora, observando a reação do rato ao ser tocado e estímulo auditivo; comportamento bizarro, em que pode ser observado o animal andando para trás e/ou apresentando comportamento estereotipado, e; resposta autonômica, como resposta pupilar ao estímulo luminoso (TEGERIS; BALSTER, 1994; BAIARD et al., 1997; WINNEKE, 2006).

Parte desses testes, como avaliação dos reflexos, estímulo auditivo e alterações autonômicas, não são relatados em qualquer dos trabalhos pesquisados sobre meios de contraste, mas optou-se por adicioná-los, em conjunto com a mensuração de ingestão de água e comida objetivando obtenção de dados mais completos para comparação sobre os efeitos adversos e colaterais associados ao uso dessas substâncias pela via intracisternal.

É importante lembrar que os componentes somatosensoriais e somatomotores da função dos nervos craniais são difíceis de avaliar em escala maior do que a categórica presente/ausente. Não obstante, os reflexos dos nervos cranianos são úteis para

descrever a severidade dos efeitos de depressores do sistema nervoso, como anestésicos gerais (ROSS, 2002).

7.1 Sinais de depressão e excitação.

7.1.1 Sinais de depressão

Apesar do grupo controle (NaCl 0,9%) não ter apresentado nenhum animal com paresia nos tempos avaliados, ou seja, com escore maior do que 1, e o iohexol ter sido o único grupo com animais apresentando imobilidade e irresposividade; estatisticamente não houve diferença significativa entre os grupos testados.

Wible et al. (1995) ao compararem dentre outros MC iodados, o iohexol e o iopamidol em ratos, verificaram hipoatividade maior com o uso do iopamidol, uma vez que esta foi observada em todas as doses testadas (a partir de 200mg I/kg) e com iohexol apenas nas doses iguais ou superiores a 600 mg I/kg.

Luzzani et al. (1999), no intuito de comparar nove MC diferentes (iomeprol, iopamidol, iohexol, ioversol, iopentol, iopromida, iofratol, iotrolan e iodixanol) realizaram a administração IC em ratos (segundo a técnica descrita por Jeffers e Griffith, 1942), e ICV em camundongos. Infelizmente, para efeitos de comparação, não foi descrita a incidência da ocorrência dos sinais clínicos em separado para cada meio de contraste, mas foram observados essencialmente depressão do sistema nervoso (sedação, dispnéia, prostração e redução da atividade motora) com alguns episódios de convulsão.

Em coelhos, Sundgreen et al. (1995) observaram após administração do iohexol, iodixanol e iotrolan, sinais de depressão mais pronunciados com o iohexol. Já em um trabalho realizado por Maly et al. (1995a), há o relato de que o iohexol produziu efeitos depressivos menos severos do que o iopamidol e mais severos do que o iodixanol e o iotrolan, quando administrados no espaço subaracnóide, sendo a diferença com o iodixanol e o iotrolan não significativa.

Conforme observado, estatisticamente não houve sinais de depressão mais acentuados com o uso de um ou outro meio de contraste, indicando que este efeito neurotóxico foi similar entre os grupos. Diferentemente dos efeitos excitatórios, efeitos depressores como dor de cabeça, tontura, náusea, e alterações psíquicas, determinados por meios de contraste no comportamento animal são mais difíceis de serem

interpretados em termos de reações adversas menores do que no homem (SUNDGREEN et al., 1995). Porém sabe-se da importância do valor preditivo dos estudos neurotóxicos de ratos e coelhos para efeitos neurotóxicos em humanos (MALY et al., 1995a; LUZZANI et al., 1997). Um exemplo disso em ratos é a iopromida, que apresentou uma toxicidade maior para o SNC em testes realizados nessa espécie, e depois quando testado em humanos por via IV, também causou uma incidência maior de efeitos adversos envolvendo especificamente o SNC se comparado tanto com o iomeprol quanto com o iopamidol (LUZZANI et al., 1997).

7.1.2 Sinais de excitação

Os sinais de excitação observados tanto com o iohexol quanto com o iobitridol, envolveram irritabilidade, hiperreflexia e convulsões (movimentos tônicos e clônicos).

Os sinais de convulsão parcial envolveram os músculos da face, acometendo um animal do grupo iobitridol 1000 mg I/kg, enquanto a convulsão generalizada ocorreu com o iohexol 400 mg I/kg. Convulsões são comumente observadas como efeito neurotóxico em trabalhos realizados em ratos e coelhos que comparam os MC. Em um estudo realizado por Shaw e Potts (1985), por exemplo, alterações locomotoras e epileptogênicas em ratos foram muito mais frequentes e mais severas após administração do iopamidol do que do iohexol.

Já Wible et al. (1995), administraram MC iodados (iohexol, ioversol, iopamidol e iopromida) via IC em ratos, e os sinais de neurotoxicidade incluíram, além dos sinais de depressão, convulsões parciais e generalizadas, tremores e sensibilidade ao toque. Todos os grupos apresentaram animais com sinais de convulsão, porém em números dispersos entre as doses, uma vez que pôde ser observados em um animal dentre cinco quando utilizados o ioversol 1000 mg I/kg, iohexol 800 mg I/kg, iopamidol 400, 600 e 800 mg I/kg e iopromida 100 mg I/kg (a qual foi a última dose testada onde os cinco animais não morreram).

Quando utilizado em coelhos, o iohexol não causou efeito excitatório no comportamento destes, enquanto o iopamidol produziu efeitos convulsivos (WHELLER; DAVIES, 1985; MALY et al., 1995a; MALY et al., 1995b; SUNDGREN et al., 1995). Quando comparados o iopamidol, o iotrolan e o iodixanol em coelhos, encontrou-se alterações excitatórias mais severas afetando significativamente mais os

animais tratados com iotrolan, enquanto o iodixanol produziu efeitos excitatórios em número semelhante ao iopamidol (MALY et al., 1995b; MALY et al., 1996).

Quanto ao tempo entre a aplicação e a ocorrência de quadros convulsivos, estes foram observados, no presente trabalho, 5 e 15 minutos após a administração, persistindo por poucos segundos, porém nos trabalhos pesquisados utilizando ratos, não foram citados o tempo decorrido entre a aplicação e a apresentação de convulsões. Já em coelhos, Maly et al. (1995b) observou o início das convulsões entre 5 e 60 minutos após completa injeção da substância.

Sinais excitatórios também são observados em estudos realizados com o iohexol e o iopamidol em cães, incluindo fasciculações do músculo temporal e facial, rigidez da musculatura cervical e também convulsões (FATONE et al., 1997).

Neste estudo observamos sinais de irritabilidade e/ou hiperreflexia em 17 animais, envolvendo tanto os grupos dos MC quanto o controle. Ralston et al. (1989) também relatam como sinais tóxicos excitatórios observados ao testar iohexol, ioversol, iopamidol e metrizamida por via IC: hiperatividade, *grooming* e movimentos mastigatórios; porém não relatam a incidência em cada grupo testado separadamente.

É importante lembrar, que o desenvolvimento de sonolência, letargia, irritabilidade e hiperreflexia podem estar associados ao aumento da pressão intracraniana, dessa forma, parte dos sinais clínicos observados pode não ser decorrente somente dos efeitos neurotóxicos das substâncias (BANSAI; DHAWAN, 2008; KILE, 2008; POLLOCK; WONG, 2008). Como não houve diferença estatística entre as doses, nem em comparação entre os MC e o grupo controle, esse sinal clínico de irritabilidade e/ou hiperreflexia presente neste trabalho, diferentemente do observado nos quadros convulsivos, parece realmente estar mais associado ao aumento de pressão intracraniana, do que a neurotoxicidade do meio de contraste em si.

7.2 Óbitos, alterações no trato respiratório

7.2.1 Óbitos

Foram observados cinco óbitos (três com o iobitridol e dois com o iohexol), sendo que quatro destes ocorreram nas duas maiores doses (três com 800 mg I/kg e 1 com 1000 mg I/kg). Apesar do índice de 6,6% de óbitos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados.

Dentre os trabalhos pesquisados, ao avaliarmos os óbitos em ratos relacionados ao uso do iohexol, há o relato de Ralston et al. (1989) com doses semelhantes às máximas aqui testadas e Wible et al. (1995), que utilizaram iohexol em doses de até 1000 mg I/kg, e em nenhum desses trabalhos foram observados óbitos relacionados a sua administração. Já com relação ao iobitridol, o único trabalho que o utiliza em ratos por essa via, não encontrou óbitos em doses de 380 mg I/kg (DONADIEU, 1996).

Com relação aos outros MC iodados não iônicos testados em ratos pela via IC, todos os animais testados com doses tão baixas quanto de 150mg I/kg de iopromida a 30%, foram a óbito, diferentemente de outros MC - iohexol, iopamidol e ioversol – testados pelos mesmos pesquisadores na mesma concentração, com doses de até 1000mg I/kg (Wible et al., 1995), onde não houve óbitos relacionados. Já Ralston et al. (1989) verificaram óbitos com o ioversol com a dose de 430 mg I/mL, permitindo a determinação do DL50 para machos, em 1000 mg I/kg. Posteriormente, esses mesmos autores compararam a toxicidade do ioversol 350 mg I/mL com o iohexol e iopamidol, encontrando uma toxicidade menor no ioversol, que mesmo na dose de 1200 mg I/kg não levou a óbito nenhum animal.

Semelhante ao encontrado no presente trabalho, onde todos os animais morreram durante ou em até 2 minutos após a aplicação, Ralston et al. (1989) encontraram, na mesma espécie, todos os óbitos ocorrendo imediatamente após a injeção. Enquanto Wible et al. (1995) relataram a ocorrência dos óbitos entre 10 minutos a 24 horas após, e; Luzzani et al (1996) em até 4 horas.

Diferenças entre os trabalhos relacionadas ao número de óbitos e tempo transcorrido até a sua ocorrência podem estar relacionadas à metodologia empregada, tanto com relação a forma de contenção do rato para a punção na cisterna, quanto a concentração do meio de contraste utilizado, o protocolo anestésico empregado, a velocidade de administração e o aquecimento prévio do meio de contraste.

Enquanto alguns autores, como Donadieu et al. (1996) não descrevem a técnica empregada para a administração intracisternal em ratos, Wible et al. (1995) e Ralston et al. (1989) utilizaram o método descrito por Merlatin et al. (1970), no qual os animais eram levemente anestesiados com éter e colocados num retrator de madeira que permitia a flexão cervical. Neste estudo, optamos pela utilização do estereotáxico, após um pré-teste comparativo entre este método e o utilizado por Merlatin et al. (1970), onde verificamos que com a metodologia empregada aqui com o estereotáxico houve menos perda de meio de contraste para o espaço subcutâneo. Posteriormente avaliamos a

diferença quanto à manutenção da agulha no local da injeção por 1 minuto e a compressão digital local por mais 1 minuto, o que comparativamente acarretou uma ocorrência ainda menor de perda do meio de contraste para fora do espaço subaracnoide. Frente a necessidade do menor extravasamento possível de meio de contraste, para a avaliação da neurotoxicidade, essa pré-avaliação foi de suma importância, pois nos gerou dados mais confiáveis, do que se tivéssemos utilizados a outra técnica.

A concentração de meio de contraste empregada pode afetar a neurotoxicidade do meio de contraste, uma vez que maiores concentrações de iodo sabidamente aumentam o risco de efeitos colaterais decorrentes do aumento de osmolalidade (FATONE et al. 1997). Dentre os estudos realizados em ratos, somente Wible et al. (1995) relataram exatamente quais os grupos de MC em que os óbitos ocorreram, ou seja, apenas nos animais em que utilizaram iopromida. Estes utilizaram somente concentração de MC de 300 mg I/mL, enquanto Luzzani et al. (1996) utilizaram MC diferentes com concentrações variando entre 300 e 370 mg I/mL, e Ralston et al. (1989) utilizaram 430 e 350 mg I/mL. Wible et al. (1996) com emprego do iohexol na mesma concentração por nós utilizada, não relataram óbito relacionado, porém no presente trabalho observamos dois. Cabe lembrar que apesar disso, não houve diferença estatística com relação ao grupo controle.

O éter anteriormente utilizado pelos autores pesquisados, não foi utilizado no presente trabalho, tanto devido sua natureza irritante, que causa aumento das secreções das vias aéreas, quanto por ser inflamável, representando um risco na realização do experimento. O protocolo anestésico utilizado, através da indução e manutenção com isoflurano, foi selecionado por ser de rápida indução e recuperação, permitindo a posterior avaliação dos efeitos neurotóxicos logo após a administração (WAYNFORTH; FLECKNELL, 1992).

Alguns pesquisadores como Wible et al. (1995), relataram a velocidade de administração - velocidade constante de 0,05 mL/s - e que as substâncias foram pré-aquecidas a 37° C antes da aplicação. Os demais autores não relataram sobre a velocidade de utilização, nem algum cuidado sobre a temperatura da substância aplicada, o que é um fator importante quando se realiza comparação entre dados encontrados por pesquisadores diferentes, em países diferentes, onde ao utilizar-se os MC à temperatura ambiente pode afetar bastante a viscosidade, visto que com o aumento da temperatura do MC iodado, tem-se a redução de sua viscosidade e

consequentemente na neurotoxicidade. No caso do iohexol e do iobitridol, o aquecimento de 20°C para 37°C, que foi a temperatura padrão utilizada nesse trabalho, significa uma redução de quase metade na viscosidade, ou seja, de 11,6 cP para 6,1 cP, e de 11 cP para 6 cP, respectivamente (TORVIK; WALDAY, 1995; UCHIYAMA et al., 2006).

7.2.2 Alteração no padrão respiratório

Conforme pôde ser observado, em todos os grupos houve animais com sinal de alteração do padrão respiratório (dispnéia, bradipnéia e apnéia). Vários artigos relatam a presença de apnéia como complicação da administração de meio de contraste por via intracisternal, ocorrendo durante ou logo após a administração, não sendo observado somente nos ratos, mas também em cães e gatos. As possíveis causas descritas para explicar essas alterações são a rápida administração do meio de contraste e o elevado volume do contraste e o aumento da pressão intracraniana. Após administrados, os efeitos desaparecem rapidamente em quase todos os casos observados (FATONE et al, 1997; TUDURY, 1997; PATSIKAS, 1999b), o que realmente ocorreu neste trabalho, excetuando-se os casos dos animais que foram à óbito.

Donadieu et al., em 1996, compararam o iohexol com o iobitridol em ratos via IC, onde o único sinal clínico observado foi insuficiência pulmonar durando aproximadamente 5 minutos, e que no caso foi atribuído a anestesia inalatória, uma vez que ocorreu em todos os grupos em proporções iguais.

Tudury et al. (1997) observaram apnéia em cães com o ioversol, enquanto Fatone et al. (1997), observaram também sinais de alterações na frequência respiratória e cardíaca durante a administração de iohexol e iopamidol. Já em experimentos realizados em gatos, Patsikas et al. (1999b) encontraram apnéia transitória de apenas alguns segundos durante a aplicação, como único efeito adverso observado com o uso do iotrolan e da solução salina (grupo controle).

O que chama a atenção ao se querer justificar a apnéia pela velocidade e/ou volume administrado, é que aqui o volume empregado foi aumentando progressivamente, atingindo uma quantidade alta, se comparado ao tamanho do animal, e mesmo assim, não se observou aumento da sua incidência com o aumento do volume administrado. Um fator que não pode ser descartado é a possibilidade de uma

sensibilidade menor dos ratos quanto ao volume injetado, se comparada a outras espécies animais.

7.2.3 Secreção nasal

Apesar da alta incidência em torno de 70% no presente experimento, a ocorrência de secreção nasal durante a aplicação das substâncias não foi relatada em nenhum dos artigos pesquisados. Talvez por não ter sido considerado relevante nas avaliações realizadas, ou talvez a presença ou ausência esteja relacionada ao método utilizado pelos demais autores.

A administração IC das substâncias por esta técnica foi selecionada por acarretar menos perda de MC para o espaço subcutâneo, se comparada a técnica de Griffith & Farris (1942) e Merlatin et al. (1974). Talvez a metodologia empregada tenha sido um fator importante para observação dessa secreção nasal durante o procedimento, acarretando um rápido aumento da pressão intracraniana, e a resultante necessidade de drenagem do LCE pelo organismo do animal. Rinorréia de LCE é um dos sinais clínicos observados em casos de aumento de pressão intracraniana em humanos. Sabe-se que o meio de contraste injetado no espaço subaracnoide é absorvido através das meninges ou granulações aracnóideas e que o grau de absorção é influenciado pela estrutura molecular do meio de contraste e provavelmente pela viscosidade. Evidências experimentais parecem ser a favor da visão de que uma significativa porção do LCE é removida do espaço subaracnóide também pelos vasos linfáticos nasais em várias espécies animais. Em ratos sabe-se que o LCE circunda o bulbo olfatório no espaço subaracnoide e flui através do forame da placa cribiforme junto com os nervos olfatórios (JOHNSTON, 2004; KOH et al., 2007; TEITELBAUM et al., 2007; SHIMAZU, 2008). Então a combinação desses fatores (drenagem do LCE pelos vasos nasais linfáticos, redução da viscosidade pelo aquecimento do MCs e a aplicação destes com auxílio do estereotáxico e da torre dorsal) parece ter contribuído para a apresentação desse sinal clínico. Assim como, talvez os óbitos observados podem estar relacionados a uma característica individual de reduzida capacidade de drenagem do LCE por esse forame.

7.3 Teste dos reflexos, reações e resposta auditiva

7.3.1 Teste dos reflexos de agarramento palmar, flexor e extensor

O reflexo de agarramento pode ser influenciado por compostos farmacológicos, tratando-se de uma resposta envolvendo o toque e a sensação proprioceptiva, aferentes sensoriais para o tálamo e córtex sensorial, e eferentes motores do cortex motor via sistema motor eferente para os músculos dos membros envolvidos na resposta. (CLASSEN, 2000).

Os componentes somatosensoriais e somatomotor dos reflexos espinhais também podem ser testados pelo reflexo flexor e o reflexo extensor. O primeiro é provavelmente mais efetivo como índice da força muscular dos membros do que um teste de nociceptores mecânicos. No entanto, a sua ausência pode fornecer importante informação na avaliação geral de depressores do SNC ou de anestésicos. Já o reflexo extensor assessa a integridade da resposta periférica e centrais sensoriomotoras, sendo utilizado para avaliar a função dos receptores de pressão e receptores de estiramento nas patas, assim como nervos motores para os músculos extensores dos membros inferiores (CLASSEN, 2000; ROSS, 2002).

No presente experimento observou-se sinais de redução do reflexo de agarramento em quatro animais, e o flexor e extensor em dois, dispersos entre os grupos, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre as doses e substâncias testadas.

Com relação ao reflexo de agarramento, os sinais persistiram em um dos animais, do grupo iohexol 800 mg I/kg até 24 horas após o procedimento. Isso provavelmente tenha sido decorrente do efeito neurotóxico do iohexol.

Já as ausências de reflexo flexor e extensor foram observadas na primeira avaliação aos 5 minutos após o procedimento, não havendo animais com déficits em avaliações posteriores. Todos estes animais com deficiência desses reflexos, apresentaram no mesmo momento outros efeitos depressivos, por apresentarem no mínimo algum sinal de desorientação e/ou apatia e/ou lentidão dos movimentos. Esses sinais podem ser decorrentes do próprio aumento de pressão intracraniana, uma vez que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Não há como comparar os dados encontrados nos reflexos, com o de outros autores, visto que nenhum dos artigos pesquisados com MC iodados realizou esse tipo de teste.

7.3.2 Testes dos reflexos palpebral, pupilar e da pina

Conforme anteriormente citado, a presença ou ausência de reflexos dos nervos cranianos também são úteis para descrever a severidade dos efeitos de depressores do SNC, sendo que o componente somatosensorial do quinto par de nervo craniano (nervo trigêmio), e o somatomotor do sétimo par (nervo facial), pode ser testado em ratos usando os reflexos palpebral e da pina, enquanto o componente autonômico dos reflexos dos nervos craniais é avaliado pelo tamanho da pupila e reflexo pupilar (O'DONOGHUE, 1996; ROSS, 2002).

Dentre os animais avaliados, 26 apresentaram alteração do reflexo palpebral, enquanto somente 1 animal foi acometido com alteração do reflexo pupilar e dois com o da pina. O reflexo palpebral foi o único reflexo que persistiu ausente em alguns animais por mais do que 24 horas.

A ausência mais significativa do reflexo palpebral, e a tendência de redução do reflexo com o aumento do volume administrado, parece estar relacionada ao aumento de pressão intracraniana por dois motivos: primeiro por ser um sinal clínico observado de forma dispersa entre os grupos, incluindo no grupo controle, e; segundo porque paralisia do sétimo par de nervo craniano é descrito em pacientes com aumento de pressão intracraniana (POLLOCK; WONG, 2008). O importante foi que apesar da ausência mais duradoura do reflexo palpebral em alguns animais, se comparado aos demais reflexos testados, houve reversão do quadro em no máximo quatro dias, indicando ser uma lesão temporária a nível de SNC.

A ausência do reflexo da pupilar e da pina podem também terem sido consequência do aumento de pressão intracraniana, já que um dos dois animais com ausência do reflexo da pina pertencia ao grupo controle.

7.3.3 Teste da reação de endireitamento, posicionamento e resposta auditiva

A propriocepção inconsciente é testada por uma variedade de reações posturais, incluindo reação de endireitamento e de posicionamento. A primeira tem sido avaliada por neurocientistas por muitos anos, particularmente para quantificar os efeitos dos depressores do SNC. Apesar de ter curta duração em animais normais (média de duração menor do que 0,4 s) trata-se de um reflexo complexo requerindo ação coordenada de diferentes músculos do pescoço, tronco e membros. Por ser um teste facilmente realizado em roedores de laboratório, e não necessitar de pré-treinamento, é geralmente incluída como um dos testes padrão para avaliação neurotoxicológica e farmacológica (ROSS, 2002; METZ, et al., 2005).

Com relação à reação de posicionamento, apesar de Classen (2000) descrever como dependente de uma resposta visual, mesmo em roedores, Ross (2002) já afirma que em virtude de sua visão fraca, a resposta é tipicamente iniciada por informação tátil fornecida pelas vibrissas.

Já o teste auditivo, assim como a resposta ao toque, não mensuram sensibilidade, e sim reatividade ao estímulo. Em conjunto, esses testes dão uma melhor mensuração dos estimulantes e depressores do SNC do que detectam alterações na sensação por si só. A redução da reatividade ao estímulo auditivo é um indicador útil de comportamento depressivo transitório resultante de efeitos farmacológicos. No entanto, em testes de toxicidade, a redução da reatividade deve ser interpretada em contexto com indicadores de indisposição e mal-estar, como perda de peso, aumento do *grooming* e hipotermia. (ROSS, 2002)

Nenhum animal apresentou alteração na reação de endireitamento nos tempos observados. Todas as respostas alteradas referentes ao teste de posicionamento e resposta auditiva foram observadas 5 minutos após a administração da substância, excetuando-se um animal do grupo iobitridol 600mg I/kg, em que os sinais de deficiência na resposta auditiva ocorreram a partir de 60 minutos, persistindo por até pelo menos quatro horas. No grupo iohexol, houve deficiência na resposta auditiva por pelo menos 15 minutos em um animal da dose 400 mg I/kg e 1000 mg I/kg, e; por no mínimo 2 horas em um da dose 600 mg I/kg.

Apesar da ausência de resposta auditiva ter sido observada também no grupo controle, neste caso ela ocorreu na avaliação de 5 minutos após o procedimento, enquanto o animal ainda apresentava com sinais alterados de estado de alerta e

locomoção, enquanto nos demais casos, que ocorreram com os MC, ela apresentou-se em animais que estavam já com estado de alerta e locomoção normais, parecendo refletir mais neurotoxicidade do que resposta ao aumento de pressão intracraniana.

A ausência da reação de posicionamento pôde ser observada em um animal até 30 minutos após a administração da substância, no grupo iobitridol 600 mg I/kg e no controle (equivalente a 800 mg I/kg). Como afetou somente dois animais, sendo um do grupo controle, este foi provavelmente relacionado ao aumento de pressão intracraniana.

Da mesma forma que os testes de reflexo acima citados, não há como realizar comparações com os experimentos realizados na bibliografia consultada, justamente por não ter sido descrito esse tipo de avaliação em meios de contraste radiológicos.

7.3.3 Outras anormalidades encontradas

Outras anormalidades neurológicas encontradas foram observadas com as três substâncias, onde o número de animais afetados foi maior com o iohexol do que no iobitridol.

Das alterações observadas, inclinação da cabeça com andar em círculo, estereotipia e ataxia já foram descritos por outros autores (RALSTED et al., 1986; LUZANNI et al. 1996) com a utilização de MC iodado, porém a retropulsão não.

A retropulsão é uma anormalidade de marcha incomum, que indica tanto persistente andar para trás, quanto forçado e repentino movimento com os membros posteriores. Tivemos a oportunidade, neste caso, de observar os dois tipos. A retropulsão tem sido ocasionalmente relatada como sinal de retirada de drogas que causam dependência, e como efeito de vários neurotóxicos que afetam a função vestibular ou sistema motor supraespinhal (ROSS, 2002). Assim, a provável causa do aparecimento desse sinal clínico foi a neurotoxicidade do iohexol.

Outra anormalidade de marcha, observada em dois casos, é a ataxia, que tem sido relatada como um sinal de neurotoxicidade para muitos agentes químicos, entre eles, os da família dos anestésicos, fármacos psicoativos, solventes orgânicos, metais pesados e inseticidas (ROSS, 2002). Porém, como foi observado em um animal do grupo controle e em outro animal com iohexol na dose mais baixa testada, tal sinal clínico pode ter sido decorrente de lesão acidental, embora tenhamos selecionado um método baseado em menores chances de ocorrência de lesão.

Já estereotipia está associada com agentes químicos que direta ou indiretamente afetam as sinapses dopaminérgicas ou colinérgicas do cérebro (ROSS, 2002), e como ela foi observada apenas em um animal do grupo iohexol, e um do iobitridol, é mais provável que o seu aparecimento seja relacionado à neurotoxicidade destes MC.

Larsen et al., 1995, observaram em camundongos, ao testar o iodixanol por via intracisternal, *head-tilt*, andar em círculo e ptose palpebral, em aproximadamente 25% dos animais, e atribuíram esse achado ao aumento de pressão hidrostática ou a lesão acidental causada pela inserção da agulha uma vez que foi observada dispersamente entre os grupos teste e controle. Dessa forma, a causa desses animais que apresentaram cabeça virada para o lado e andar em círculo, pode tanto ser relacionada à neurotoxicidade, já que se apresentou apenas em grupos onde foi utilizado MC (um de cada), quanto pelo rápido aumento da pressão intracraniana, ou lesão acidental. A escolha da velocidade de administração foi baseada no trabalho de Wible et al. (1996), porém se comparada ao tamanho do animal e ao volume administrado, acreditamos ser uma velocidade rápida, sujeita a causar transtornos no animal em decorrência da rápida elevação da pressão intracraniana.

7.4 Massa corporal e consumo de ração e água (%)

7.4.1 Massa corporal

Assim como em humanos, onde a náusea e o vômito após administração subaracnóide de iohexol e outros meios de contraste são efeitos adversos observados (CARROLL, et al.,1997), em cães o uso de iohexol também já foi associado a vômitos (SARMENTO, 2000). Com o intuito de estimar a náusea, indisposição e mal-estar desses animais, a massa corporal, o consumo percentual de ração e água foram mensurados diariamente durante o período de observação de sete dias, porém, assim como dados publicados por Donadieu et al. (1996), as massas corporais quando comparadas com o controle não obteve diferença estatisticamente significativa entre eles. Donadieu et al. (1996), assim como no presente trabalho, comparou o iohexol com o iobitridol, porém com doses de 380 mg I/kg, diferente daqui onde utilizou-se doses menores e maiores do que essa, visando uma melhor comparação da neurotoxicidade dos dois fármacos.

7.4.2 Consumo percentual de ração e água (%)

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupos utilizados, não indicando sinais de indisposição, náusea e/ou mal-estar, com a utilização desses meios de contraste nessa espécie animal. Isso pode refletir uma menor susceptibilidade desses sinais clínicos, nessa espécie animal, quanto à utilização de MC iodados, porém mais estudos seriam necessários, com um número maior de animais, para realizar tal afirmação.

7.5 Achados macroscópicos e análise histopatológica

Assim como dados encontrados em outros experimentos realizados em ratos, utilizando MC iodados solúveis em água por via IC, o exame macroscópico e microscópico dos órgãos coletados no presente experimento não revelou qualquer sinal de alteração, nem mesmo naqueles que foram a óbito durante o procedimento. Esse achado é semelhante ao observado por Larsen et al. (1995) que realizaram experimentos em camundongos e; Luzzani et al., (1996), que utilizaram nove MC por via IC e ICV em ratos e camundongos e não encontraram anormalidades no exame *post-mortem*. Já, Ralston et al. (1989) diferentemente dos anteriormente citados, encontraram sinais de hemorragia grosseira da meninge somente após necropsia dos animais que morreram durante e imediatamente após o procedimento, porém nenhum outro sinal de lesão ou anormalidade foi observado.

Sundgreen et al. (1995) também não encontraram alteração macroscópica no cérebro e nem hemorragia subaracnoide, intraventricular ou intracerebral em coelhos que entraram em convulsão após administração de MC iodados por via IC.

A aracnoidite é frequentemente encontrada após administração de meio de contraste oleoso para mielografia, mas raro após os solúveis em água, portanto, sua presença realmente não era esperada, uma vez que o experimento foi realizado somente com MC hidrossolúveis (SHAW; POTTS, 1985; TORVIK; WALDAY, 1995).

Em cães, alguns trabalhos apresentaram sinais de alteração no sistema nervoso central após testarem-se alguns meios de contraste. Em um estudo testando o iodixanol, quando este foi utilizado na dose 256 mg I/kg, o mesmo causou inflamação de meninge e/ou necrose em 2 de 16 cães (SPENCER; GOA, 1996). Já outro estudo envolvendo

iohexol, iopamidol e ioversol em cães, com doses de 160 e 240 mg I/kg, não apresentaram sinais de alterações após 14 dias da aplicação (RALSTON et al., 1995).

7.6 Avaliação geral dos dados obtidos

A tolerância ao meio de contraste é influenciada primariamente pela quimiotoxicidade. Vários parâmetros tem impacto na neurotoxicidade dos MC iodados. Alguns pesquisadores enfatizam uma correlação inversa entre a hidrofiliicidade dos compostos e seu grau de neurotoxicidade, ou seja, quanto mais hidrofílico for o meio de contraste, menor será sua neurotoxicidade, isso porque a membrana celular protege os neurônios da penetração dos meios de contraste radiológicos, e uma vez dentro da célula o agente pode romper o metabolismo do carboidrato, o *turnover* do fosfatidilinositol e condução de potenciais de ação podendo causar hiperpolarização do potencial de membrana em repouso. O MC mais hidrofílico terá mais dificuldade de atravessar a membrana e causar neurotoxicidade. Essa informação a respeito da hidrofiliicidade pode ser obtida pelo coeficiente octanol:água (BREE et al, 1991; WIBLE et al., 1995; LUZZANI, 1996; SARMENTO, 2000).

Quanto mais a osmolalidade do produto se aproximada do LCE, menor o seu efeito sobre o tecido nervoso, pois se sabe que soluções hipertônicas provocam desequilíbrio iônico neuronal desencadeando frequentemente convulsões. (SARMENTO, 2000). No que tange a aplicação IV, relata-se que o papel da osmolalidade ainda seja maior na neurotoxicidade do MC, já que estes causam difusão da água para fora das células endoteliais, causando desidratação e redução no tamanho das mesmas, o que facilitaria a abertura das junções *tigh* entre as células endoteliais da barreira hematoencefálica permitindo que os meios de contraste entrem em contato com os tecidos neuronais (WOOD et al., 1985; WIBLE et al., 1995; UCHIYAMA et al., 2006).

Estão descritas na Tabela 4 as características físico-químicas do iohexol e do iobitridol, e como pode ser observado eles são semelhantes em termos de hidrofiliicidade (coeficiente de partição octanol/água), osmolalidade e viscosidade. Esse último fator também tem sido citado como responsável por causar neurotoxicidade, por isso a indicação benéfica de aquecimento do MC antes da administração (TORVIK; WALDAY, 1995)

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas do iohexol e do iobitridol.

	Iohexol (300 mg I/kg)	Iobitridol (300 mg I/kg)
Coefficiente de partição (octanol:água)	-2,71	-2,63
Osmolalidade (mOsm/kg)	690	695
Viscosidade (cP a 20°C)	11,6	11
Viscosidade (cP a 37°C)	6,1	6
Peso molecular	614	835

Nota: adaptado de Wible et al., 1995; Hoogewoud; Woessmer, 1996; Dencausse et al., 1996; Donadieu, 1996; Violon, 2001; Davidson et al., 2006.

Segundo Luzzani et al. (1996) e Patsikas et al. (1999a) a neurotolerabilidade dos meios de contraste não iônicos parecem depender menos de características físico-químicas das formulações farmacêuticas do meio de contraste e mais na sua estrutura química, que é o que certos receptores reconhecem. A capacidade ligante do MC às membranas neuronais e sua concentração intracelular são os fatores chave para neurotoxicidade. A fórmula do iobitridol é baseada na hidrofiliabilidade balanceada, e diferentemente do iohexol, sua molécula tem uma capacidade limitada de deformação em contato com membranas hidrofílicas, o que deveria reduzir o número de reações adversas (DENCAUSSE et al, 1995; TROCHERIE et al., 1995; DONADIEU, 1996); no entanto, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados, ou seja, nesse modelo animal o iobitridol demonstrou ser tão pouco neurotóxico quanto o iohexol, tornando-o uma possibilidade de alternativa para utilização pela via subaracnoidea para realização de mielografias. O iobitridol preenche a maioria dos demais requisitos necessários para ser utilizado para mielografia; é miscível no líquido, hidrossolúvel e radiopaco.

É importante ter em mente, independentemente do MC iodado selecionado para administração subaracnoidea, que em caso de desidratação, essa deve ser corrigida antes da mielografia, caso contrário, além dos riscos anestésicos, ocorre reabsorção retardada do meio de contraste resultando em neurotoxicidade desnecessária. Também com relação a anestesia, é imprescindível a verificação de antecedentes convulsivos, tolerância a anticonvulsivantes, reações anteriores a drogas anestésicas, além do estado orgânico geral do paciente. (SARMENTO, 2000).

8. CONCLUSÃO

- Quando utilizado neste modelo animal, o iobitridol por via subaracnóide não demonstrou acarretar sinais de neurotoxicidade maiores do que as observadas com o iohexol (MC iodado tipicamente recomendado para utilização mielográfica).
- O iobitridol preenche a maioria dos demais requisitos necessários para ser utilizado para mielografia; é miscível no líquido, hidrossolúvel, radiopaco, e apresentou sinais de neurotoxicidade similares ao iohexol nas doses testadas de 200, 400, 600, 800 e 1000 mg I/kg, após prévio aquecimento a 37°C.
- O método selecionado de contenção, com utilização de aparelho de estereotaxia, correto posicionamento do paciente, manutenção da agulha após a administração do fármaco por 1 minuto e posterior compressão no local da agulha por mais 1 minuto se mostrou eficaz para comparação de neurotoxicidade de substâncias aplicadas por via IC
- Os testes de reflexos: tátil de agarramento palmar, flexor, extensor, palpebral, pupilar e da pila; reação de endireitamento e posicionamento, e; resposta auditiva se mostraram eficientes na determinação da neurotoxicidade dos MC iodados.
- Mais estudos são recomendados em cães e gatos antes da indicação do iobitridol como agente mielográfico para estas espécies, porém esses dados sugerem a possibilidade de sua utilização como uma alternativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEN, T. Visipaque – a step forward. **Acta Radiologica**, v. 36, suppl 399, p. 2-18. 1995.
- ASPELIN, P., et al. Classification and terminology. In: THOMSEN, H. S.; WEBB, J. A. W. **Contrast media – safety issues and ESUR guidelines**. Berlin: Springer, 2009. p. 43-52.
- BAIRD, S. J. S.; CATALANO, P. J.; RYAN, L. M.; EVANS, J. S. Evaluation of effect profiles: functional observational battery outcomes. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.40, p. 37-51. 1997.
- BANSAI, S.; DHAWAN, A. Acute liver failure. In: KLEINMAN, R. E.; GOULET, O.; MIELI-VERGANI, G.; SANDERSON, I. R.; SHERMAN, P.; SHNEIDER, B. L. **Pediatric gastrointestinal disease**. Hamilton: BC Decker, v.2, 2008, p. 1117-1130.
- BARONE, G., et al. Risk factors associated with development of seizures after use of iohexol for myelography in dogs: 182 cases (1998). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.220, n.10, p. 1499-1502. mai. 2002.
- BENDER, A., et al. Severe symptomatic aseptic chemical meningitis following myelography – the role of procalcitonin. **Neurology**, v.63, p. 1311-1313. 2004.
- BETTMANN, M. A. Contrast media: safety, viscosity, and volume. **European Radiology Supplement**, v.15, suppl.4, p. D62-64. 2005.
- BOURIN, M.; JOLLIET, P.; BALLEREU, F. An overview of the clinical pharmacokinetics of X-ray contrast media. **Clinical Pharmacokinetics**, 32, 3, p. 180-193. mar. 1997.
- BOURRINET, P., et al. High-performance liquid chromatographic determination of iobitridol in plasma, urine and bile. **Journal of Chromatography B**, 670, p. 369-372. 1995.
- BREE, H. RIJSSEN, B. V. HAM, L. V. Comparison of nonionic contrast agents iohexol and iotrolan for cisternal myelography in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n.6, p. 926-933. jun. 1991.
- BUSSI, S.; MORISSETI, A. Margins of safety of intravascular contrast media: body weight, surface area or toxicokinetic approach. **Arhiv za Higijenu Rada I Toksikologiju**, v. 56, p. 157-160, 2005.
- CAILLE, J. M.; ALLARD, M. Neurotoxicity of hidrosoluble iodine contrast media. **Investigative Radiology**, v.23, suppl.1, p. S210-S212. 1988.
- CARROLL, G. L., KLEENE, B. W.; FORREST, J. L. Asystole associated with iohexol myelography in a dog. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 38, n. 4, p. 284-287. 1997.

CHRISTIANSEN, C. X-ray contrast media – an overview. **Toxicology**, v.209, p. 185-187. 2005.

CLASSEN, W. Behavior, neurology and electrophysiology. In: KRINKE, G. J. **The laboratory rat**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 419-436.

DAVIDSON, C., et al. Contrast medium use. **The American Journal of Cardiology**, v. 98, n.6, p. 42K – 58K. sep. 2006.

DENCAUSSE, A., et al. Comparative study of the dialysability of iobitridol and iohexol in the rat with impaired renal function. **Acta Radiologica**, 36, p. 545-548. 1995.

DENCAUSSE, A., et al. Pharmacokinetic profile of iobitridol. **Acta Radiologica**, v.37, suppl. 400, p. 25-34. 1996.

DICKINSON, M. C.; KAM, P. C. A. Intravascular iodinated contrast media and the anaesthetist. **Anaesthesia**, 63, p. 626-634. 2008.

DONADIEU, A. M. et al. Toxicologic profile of iobitridol, a new nonionic low-osmolality contrast medium. **Acta Radiologica**, v.37, suppl.400, p. 17-24. 1996.

FATONE, G. et al. Myelography in the dog with non-ionic contrast media at different iodine concentrations. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, p. 292-294. 1997.

FIIRGAARD, B., et al. Intracranial iotrolan distribution following cervical myelography - postmyelographic registration of adverse effects, psychometric assessment and electroencephalographic recording. **Acta Radiologica**, v.36, n.1, p. 77-81. 1995.

GERLINDE, A. M.; KOLB, B.; WHISHAW, I. Q. Neuropsychological tests. In: WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. **The behavior of the laboratory rat**. Nova York: Oxford University Press, 2005. p. 475-498.

HAMM, T. E. VASBINDER, M. A.; KING_HERBERT, A. Toxicology. In: SUCKOW, M.A.; WEIABROTH, S. H. FRANKLIN, C. L. **The laboratory rat**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2 ed., 2006, p. 803-816.

HARIA, M.; BROGDEN, R. N. Iohexol: a review of its pharmacological properties and use as a contrast medium in myelography and neuroangiography. **CNS drugs**, v.7, n.3, p. 229-255, mar. 1997.

HECHT, S. et al. Myelography vs. computed tomography in the evaluation of acute thoracolumbar intervertebral disk extrusion in chondrodystrophic dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.4, n.50 p. 353-359. 2009.

HODGSON, E.; CUNNY, H. Toxicity testing. In:___ Hodgson, E. **Textbook of modern toxicology**. Hoboken: John Wiley & Sons, 4 ed. 2010, p. 409-456.

HOOGEWOU, H. M.; WOESSMER, B. Iobitridol 300 compared to iopromida 300 – a double-blind randomized phase-III study of clinical tolerance in total body CT. **Acta Radiologica**, v.37, suppl. 400, p. 62-64. 1996.

ISERI, T.; YaAMADA, K.; UENO, H. Lumbosacral myelography in dogs - a safer technique. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.66, n.1, p. 71-72. 2004.

ISRAEL, S. K.; LEVINE, J. M.; KAERWIN, S. C.; LEVINE, G. J.; FOSGATE, G. T. The relative sensitivity of computed tomography and myelography for identification of thoracolumbar intervertebral disk herniations in dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.50, n.3, p. 247-252. 2009.

JOHNSTON, M., et al. Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-primates and other mammalian species. **Cerebrospinal Fluid Research**, v.1, n.2, p. 1-13. dec. 2004.

KATAYAMA, H., et al. Clinical experience with iomeprol in myelography and mielo-CT – Clinical pharmacology and double-blind comparisons with iopamidol, iohexol, and iotrolan. **Investigative Radiology**, v.6, n.1, p. 22-32. 2001.

KYLE, T. Nursing care of the child with a neurologic disorder In: ___ **Essentials of pediatric nursing**. China: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. p. 466-516.

KLEIN, K. M., et al. Status epilepticus and seizures induced by iopamidol myelography. **Seizure**, v. 13, n. 3, p. 196-199, abr. 2004.

KOH, L. NAGRA, G.; JOHNSTON, M. Properties of the lymphatic cerebrospinal fluid transport system in the rat: impact of elevated intracranial pressure. **Journal of Vascular Research**, v.44, p. 423-432, jun. 2007.

LARSEN, J. L., et al. Neural tolerability of iodixanol in mice and dogs after single and repeated intracisternal administration. **Acta Radiologica**, 399, p. 238-43, 1995.

LEBEDEV, S. V.; BLINOV, D. V.; PETROV, S. V. Spatial characteristics of cisterna magna in rats and novel technique for puncture with a stereotactic manipulator. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v.137, n.6, p. 635-638, jun. 2004.

LEFEVRE, T., et al. Safety and efficacy of the new iodinated nonionic low-osmolality contrast medium iobitridol (Xenetix) in coronary and ventricular angiography. **Acta Radiologica**, suppl. 400, v.37, p. 75-80. 1996.

LEMIERE, J. Xenetix – a milestone in diagnostic imaging. **Acta Radiologica**, suppl. 400, v.37, p. 1-2. 1996.

LEWIS, D. D.; HOSGOOD, G. Complications associated with the use of iohexol for myelography of the cervical vertebral column in dogs: 66 cases (1988-1990). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.200, n.9, p. 1381-1384, 1992.

LUZZANI, F., et al. Neurotolerability of nonionic x-ray contrast media – the role of chemotoxicity. **Investigative Radiology**, v.31, n.6, p. 338-344, jun. 1996.

MALY, P., et al. Adverse reactions in myelography – correlation between animal research and clinical practice. **Acta Radiologica**, v.36, suppl. 399, p. 230-237. 1995a.

MALY, P. et al. Neural tolerance of the non-ionic dimmers iodixanol and iotrolan and the non-ionic monomer iopamidol during myelography in non-anaesthetised rabbits. **Acta Radiologica**, v.36, p. 644-648. 1995b.

MALY, P.; SUNDGREN, P. BAATH, L. Neural tolerability of commercial preparations of iodinated nonionic monomers and dimmers: comparison in an animal model. **Academic Radiology**, v.3, p.S220-222. 1996.

MCCLENNAN, B. L. Low-osmolality contrast media: premises and promises. **Radiology**, v.162, p. 1-8, jan. 1987.

METZ, G. A.; KOLB, B.; WHISHAW, I. Q. Neuropsychological tests. In: WHISHAW, I. Q.; KOLB, B. **The behavior of the laboratory rat**. Nova York: Oxford University Press, 2005. p. 462-474.

NEGRIN, A.; SCHATZBERG, S.; PLATT, S. The paralyzed cat – neuroanatomic diagnosis and specific spinal cord diseases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.11, p. 361-372. 2009.

NIROGI, R., et al. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for assessment of drug penetration in the central nervous system. **Journal of Neuroscience Methods**, v.178, p. 116-119. 2009.

NOCE, A. L., et al. Preclinical safety assessment of iomeprol for injection as contrast medium for myelography. **European Journal of Radiology**, suppl.1, v.18 , p. S43-S50. 1994.

NOCE, A. L., et al. Conditioned taste aversion in rats following intrathecal administration of contrast media. **Acta Radiologica**, v.37, p. 116-120, 1996.

O'DONOGHUE, J. L. Clinical neurologic indices of toxicity in animals. **Environmental Health Perspectives**, suppl. 2, v.104, p. 323-330, apr. 1996.

PALMERS, Y., et al. Comparison in myelography between iodixanol 270 and 320 mgI/mL and iotrolan 300 mgI/mL: a multicentre, randomized, parallel-group, double-blind, phase III trial. **European Radiology**, v. 12, p. 686-691. 2002.

PATSIKAS, M. N. Absence of cerebrospinal fluid abnormalities and spinal cord lesions after iotrolan cervical myelography in normal cats: na open placebo-controlled study. **Journal of Veterinary Medicine**, v.46, p. 453-457. 1999a.

PATSIKAS, M. N., et al. Absence of postmyelographic adverse effects and high radiographic resolution of iotrolan used in the cervical myelography for the clinically normal cat: na open-placebo controlled study. **Journal of Veterinary Medicine**. v.46, p. 69-74. 1999b.

PETERSEIN, J., et al. Results of the safety and efficacy iobitridol in more than 61.000 patients. **European Radiology**, v.13, p. 2006-2011. 2003.

POLLOCK, M; WONG, T. CNS trauma: Increased ICP diagnosis. MODAK, R. K. **Anesthesiology keyword review**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008 p. 109-110.

RALSTON, W. H., et al. Acute and subacute toxicity of ioversol in experimental animals. **Investigative Radiology**, suppl. 1, v.24, p. S2-S9. 1989.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 2 ed., 1989. p. 779.

ROSS, J. F. Relationship between functional and morphologic endpoints in neurotoxicity testing. **Toxicologic Pathology**, n.1, v. 28, p. 132-136. 2000.

ROSS, J. F. Neurological assessment in regulated animal safety studies cap 19. In: MASSARO, E. J. **Handbook of neurotoxicology**. New Jersey: Humana Press Inc., 2 ed., 2002. p. 461-506.

SAGE, M. R. Kinetics of water-soluble contrast media in the central nervous system – review. **American Journal of Radiology**, v.141, p. 815-824. 1983.

SARMENTO, L. V. C., et al. Mielografia em cães e gatos- revisão. **Clínica Veterinária**, n. 26, v. 5, p. 23-32, mai/jun. 2000.

SARMENTO, L. V. C., et al. Mielografia em cães sadios com o meio de contraste ioversol. Resultados líquóricos e anatomo-histopatológicos. **Ciência Rural**, v.32, n.3, p. 427-432. 2002.

SHAW, D. D.; POTTS, D. G. Toxicology of iohexol. **Investigative Radiology**, v.20, n.1, suppl, jan/fev, p. S10-3. 1985.

SHIMIZU, J., et al. The difference of contrast effects of myelography in normal dogs: comparison of iohexol (180 mgI/mL), iohexol (240 mgI/mL) and iotrolan (240 mgI/mL). **Journal of Veterinary Science**, v.70, n.7, p. 659-663. 2008.

SOVAK, M.; SIEFERT, H. M.; RANGANATHAN, R. Combined methods for assessment of neurotoxicity: testing of new nonionic radiographic media. **Investigative Radiology**, v.15, n.6, nov./dez. P. S248-S253, 1980.

SOVAK, M.; DEUTCH, J. A.; RANGANATHAN, R. Evaluation of intrathecal contrast media by aversion conditioning in rats. **Investigative Radiology**, v.17, n.1, p. 101-106, jan/fev. 1982.

SPECK, U.; PRESS, W. R.; MUTZEL, W. Osmolality-related effects injections into the central nervous system. **Investigative Radiology**, v.23, suppl 1, p. S. 114-S117. 1998.

SPENCER, C. M. GOA, K. L. Iodixanol – a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and diagnostic use as x-ray contrast medium. **Drugs**, v.52, n.6. p. 889-927. 1996.

STACUL, F. Current iodinated contrast media. **European Radiology**, v.11, p. 690-697. 2001.

STACUL, F.; THOMSEN, H. S. Nonionic monomers and dimmers. **European Radiology**, 6, p. 756-761, 1996.

SUNDGREN, P. BAATH, L.; MALY, P. CNS- effects from subarachnoid injections of iohexol and the non-ionic dimmers iodixanol and iotrolan in the rabbit. **Acta Radiologica**, v. 36, n. 3, p. 307-311. 1995.

TAKAHASHI, M., et al. Neurotoxicity of gadolinium contrast agents for magnetic resonance imaging in rats with osmotically disrupted blood-brain barrier. **Magnetic resonance imaging**, v.14, n. 6, p. 619-623. 1996.

TAKASUGI, Y., et al. Transcutaneous cisternal puncture for sampling of cerebrospinal fluid in awake rat. **Experimental animals**, v.54, n.2, p. 193-196. 2005.

TANAKA, H.; NAKAYAMA, M.; TAKASE, K. Usefulness of myelography with multiple views in diagnosis of circumferential location of disc material in dogs with thoracolumbar intervertebral disc herniation. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 66, n. 7, p. 827-833. 2004.

TEGERIS, J. S.; BALSTER, R. L. A comparison of the acute behavioral effects of alkylbenzenes using a functional observational battery in mice. **Fundamental and applied toxicology**, v.22, p. 240-250. 1994.

TEITELBAUM, J. E.; DEANTONIS, K. O.; KAHAN, S. Increased intracranial pressure. In: ___ **Pediatric signs & symptoms**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 32.

TORVIK A.; WALDAY, P. Neurotoxicity of water-soluble contrast media – a review. **Acta Radiologica**, v.36, suppl. 399, p. 221-229. 1995.

TUDURY, E. A., et AL. Meio de contraste ioversol em neuroradiologia canina. **Ciência Rural**, v.27, n.4, p. 619-623. 1997.

TRINDADE, R.; TRINDADE. Uso experimental do iobitridol na mielografia em cães e gatos (relato de casos). **Nosso Clínico**, v.9, n.51, p. 44-53, mai./jun. 2006.

TROCHERIE, S., et al. Electroencephalographic evaluation of iobitridol a nonionic contrast medium, during selective cerebral arteriography in rabbits. **American Journal of Neuroradiology**, v.16, p. 1635-1642, set. 2005.

UCHIYAMA, Y., et al, Factors contributing to blood-brain barrier disruption following intracarotid injection of nonionic iodinated contrast medium for cerebral angiography: experimental study in rabbits. **Radiation Medicine**, v.24, p. 321-326. 2006.

VAN BREE, H.; Van Rijssen, B.; Van Ham, L. Comparison of nonionic contrast agents iohexol and iotrolan for cisternal myelography in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 6, jun. 1991.

VESCE, G., et al. Anaesthesia for myelographic examination in small animals: a retrospective study. In: 12th annual conference of European Association of Veterinary Diagnostic Imaging, 2005, Naples. Disponível em: www.ivis.org/proceedings/EAVDI/2005/posters.pdf. Acesso em 10 mai. 2010.

VIOLON, D. Stabilization of the hydrophilic sphere of non-ionic monomers: are all protect in a similar way? **The British Journal of Radiology**, 74, p 1097-1102, 2001.

WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P. A. Anaesthesia and postoperative care. In: _____. **Experimental and surgery in the rat**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 102-190.

WEINMANN, H. J., et al. Contrast media: future aspects. **European Radiology Supplement**, v.15, Suppl.4, p. D70-D73, 2005.

WHEELER, S. J.; DAVIES, J. V. Iohexol myelography in the dog and cat: a series of one hundred cases, and comparison with metrizamide and iopamidol. **Journal of Small Animal Practice**, v. 26, p. 247-256. 1985.

WIBLE, J. H., et al. Neurotoxicity of non-ionic x-ray contrast media after intracisternal administration in rats. **European Journal of Radiology**, v.19, p. 206-211. 1995.

WIDMER, W. R., et al. Iohexol and iopamidol myelography in the dog: a clinical trial comparing adverse effects and myelography quality. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v. 33, n. 6, p. 327-333. 1992.

WINNEKE, G. Behavior toxicology. In: DUFFUS, J. H.; WORTH, H. G. J. **Fundamental toxicology**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2006. p. 218-237.

WOOD, A. K.; FARROW, B. R. H; FAIRBUM, J. Cervical myelography in dogs using iohexol. **Acta Radiologica Diagnostica**, v.2, n. 5, v. 2, p. 767-770, 1985.