

Hugo Eckener Dantas de Pereira Cardoso

Efeitos determinados pela administração subaracnoidea de dexmedetomidina, em dose única, sobre a medula espinal e as meninges de coelhos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Profa. Titular Eliana Marisa Ganem

Botucatu – SP

2015

“ **É** preferível arriscar coisas grandiosas. Alcançar triunfo e glória mesmo expondo-se à derrota, do que formar filas com os pobres de espírito, que nem gozam muito e nem sofrem muito porque vivem nesta penumbra cinzenta que não conhece vitória e nem derrota”.

Theodore Roosevelt

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a três pessoas muito especiais, três mulheres:

à Elvira, minha mãe, sem a qual nada disso existiria, sendo elemento principal da minha formação;

à Iara, minha irmã, pode-se dizer uma segunda mãe;

à Ticiane, minha esposa, que participou incondicionalmente desta etapa, trazendo ainda Matheus e Maria Luíza, que têm me ensinado o sentido da vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof. Titular Eliana Marisa Ganem,

pela orientação, dedicação, paciência e confiança durante a elaboração desta tese.

Serei eternamente grato!

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho não seria possível sem o apoio de pessoas, que foram de fundamental importância ao longo da minha vida. Um muito obrigado!

Ao meu pai, que se aqui estivesse estaria radiante.

À Ticiano pelo apoio, compreensão, carinho e companheirismo.

À minhas irmãs, Maria Teresa, Ana, Iara e Regina, pelo exemplo e apoio ao longo do tempo.

Ao Jeconias Neiva Lemos, pelo apoio, amizade e exemplo de vida.

Ao Bruno Gardélio Pedreira de Cerqueira, pelo incentivo e amizade.

Ao Anderson Cardoso Gazineu, que levou todos nós para Unesp.

Ao Rodrigo e Jonga, pela amizade e companheirismo nessa jornada.

Ao Luciano Garrido, pela amizade e oportunidades.

Ao Carlos Eduardo, pela amizade e exemplo, sem falar no apoio durante essa jornada.

Ao José Admirço Lima Filho, pelo apoio incondicional nesses anos, seja de forma direta ou indireta, você foi fundamental.

À Stela, pela ajuda e colaboração.

Aos profissionais da Clínica de Anestesia de Salvador, pelo apoio.

À dona Joana Jacirene Costa Teixeira, secretária do Departamento de Anestesiologia, pela presteza e pelo trabalho gráfico.

À Nelí Aparecida Pavan e demais funcionários do Departamento de Anestesiologia da Unesp, pela disponibilidade e auxílio.

À aluna de graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu Natália Castro Fim, pelo auxílio na execução da pesquisa experimental.

À Profa. Dra. Vânia Maria Vasconcelos Machado, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pelo auxílio com a ultrassonografia.

À Profa. Adjunta Mariângela Esther Alencar Marques, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio na leitura das lâminas histológicas.

Ao Prof. Dr. Hélio Miott, do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio na avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de iniciação científica à aluna de graduação. Processo 2011/22262-1.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADRO

Figura 1	Segmento da região posterior da medula espinal. GFAP 40x.....	33
Figura 2	A. Área selecionada do tecido neural. B. Área binarizada após o processamento da imagem, resultando em 45% do tecido marcado.....	34
Figura 3	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de animal do G1 (C5). H&E 2x.....	39
Figura 4	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de animal do G1 (C5). H&E 10x.....	39
Figura 5	Tecido nervoso normal (A), vasos sanguíneos normais (B) e discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário entre na pia-máter e aracnoide com áreas focais de adesão (C) de animal do G2 (C6). H&E 3,5x.....	40
Figura 6	Tecido nervoso normal (A) e discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário entre na pia-máter e aracnoide com áreas focais de adesão (B) de animal do G2 (C6). H&E 18x.....	40
Figura 7	Tecido nervoso normal (A) e discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário entre na pia-máter e aracnoide com áreas focais de adesão (B) de animal do G2 (C6). H&E 30x.....	41
Figura 8	Tecido nervoso normal (A), infiltrado linfoplasmocitário perivascular com áreas de espessamento da pia-mater e da aracnoide (B e C) de animal do G2 (C7). H&E 6x.....	41
Figura 9	Tecido nervoso normal (A), infiltrado linfoplasmocitário perivascular com áreas de espessamento da pia-mater e da aracnoide (B e C) de animal do G2 (C7). H&E 20x.....	42
Figura 10	Tecido nervoso normal (A), infiltrado linfoplasmocitário perivascular com áreas de espessamento da pia-mater e da aracnoide (B e C) de animal do G2 (C7). H&E 40x.....	42
Figura 11	<i>Box-Plot</i> da mediana e 1º e 3º quartis do percentual das células do tecido nervoso marcadas pelo GFAP dos grupos estudados.....	43

Tabela 1	Peso (g) e comprimento de medula espinal (cm). Valores expressos em média \pm desvio padrão (dp).....	37
Tabela 2	Resultados histológicos do tecido nervoso e das meninges dos animais pertencentes ao G2.....	38
Quadro 1	Algoritmo de processamento das imagens para quantificação imuno-histoquímica.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	20
3 MÉTODO	22
3.1 Animais utilizados.....	23
3.2 Grupos experimentais.....	23
3.3 Sequência experimental.....	23
3.4 Técnicas utilizadas.....	25
3.4.1 <i>Preparo do animal</i>	25
3.5 Punção subaracnóidea.....	25
3.5.1 <i>Técnica de punção</i>	25
3.5.2 <i>Volume injetado</i>	26
3.5.3 <i>Solução administrada</i>	26
3.6 Observação clínica.....	27
3.7 Sacrifício.....	27
3.8 Exame histológico.....	28
3.8.1 <i>Técnica imuno-histoquímica para GFAP</i>	28
3.9 Comissão de Ética em Experimentação em Animal.....	34
3.10 Modelo de estudo.....	35
3.11 Método estatístico.....	35
4 RESULTADOS	36
5 DISCUSSÃO	44
5.1 Discussão da metodologia.....	45
5.1.1 <i>Ultrassonografia como guia de punção</i>	45
5.1.2 <i>Grupos experimentais</i>	46
5.1.3 <i>GFAP</i>	47
5.1.4 <i>Tempo de observação clínica no cativeiro</i>	48
5.1.5 <i>Dexmedetomidina</i>	48
5.2 Discussão dos resultados.....	50
6 CONCLUSÃO	52
7 REFERÊNCIAS	54

RESUMO / ABSTRACT

Cardoso HEDP. Efeitos determinados pela administração subaracnoidea de dexmedetomidina, em dose única, sobre a medula espinal e as meninges de coelhos. Botucatu, 2015. 60p. Tese (Doutorado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de Botucatu.

RESUMO

Introdução: a dexmedetomidina é um enantiômero dextrógiro da medetomidina, possui importantes ações sedativas e analgésicas. A dexmedetomidina é empregada como medicação pré-anestésica ou associada à anestesia pelas vias intravenosa, muscular, peridural ou subaracnoidea. Estudos clínicos mostram que quando utilizada no espaço peridural de seres humanos a dexmedetomidina não desencadeou lesões neurológicas. Pela via subaracnoidea a associação de pequenas doses do fármaco (3-10 µg) com o anestésico resultou em aumento no tempo dos bloqueios sensitivo e motor, com manutenção da estabilidade hemodinâmica e algum grau de sedação. Os estudos sobre os efeitos da dexmedetomidina introduzida no espaço subaracnoideo, além de escassos, não asseguram que o agente não causa lesões neurológicas.

Objetivo: avaliar os efeitos que a dexmedetomidina, administrada pela via subaracnoidea em dose única, determina sobre a medula espinal e as meninges de coelhos. **Método:** vinte coelhos adultos jovens, fêmeas, pesando entre 3200 a 4900 gr com comprimento de coluna vertebral entre 36 e 40 cm foram divididas, por sorteio, em dois grupos (G): G1 solução fisiológica 0,9%, G2 dexmedetomidina (10 µg). Após anestesia venosa com cetamina e xilazina foi realizada punção subaracnoidea em S1-S2 guiada por ultrassom e injetada a solução sorteada. Os animais permaneceram em cativeiro por 21 dias sob observação clínica e foram sacrificados por decapitação e retirada a porção lombo-sacral da medula espinal para exame histológico [Hematoxilina e eosina (HE) e imuno-histoquímica para proteína glial fibrilar ácida (GFAP)].

Resultados: nenhum animal apresentou lesão histológica de tecido nervosa, entretanto 9 animais apresentaram alterações em meninges. **Conclusão:** neste modelo experimental em coelhos, a dexmedetomidina administrada no espaço subaracnoideo em dose única, não desencadeou alterações histológicas sobre o tecido medular, entretanto foram encontradas alterações histológicas em meninges.

Palavras-chave: dexmedetomidina, coelhos, injeção subaracnoidea, toxicidade meníngea.

Cardoso HEDP. Effects of dexmedetomidine, administered by the intrathecal route in single puncture, determines on the spinal cord and meninges of rabbits. Botucatu, 2015. 60p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology), Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", câmpus de Botucatu.

ABSTRACT

Background: dexmedetomidine is a dextrorotatory enantiomer of medetomidine, has important sedative and analgesic actions. This drug is used as premedication or associated with anesthesia by intravenous, muscular, epidural or subarachnoid. Clinical studies show that when used in the epidural space of human's dexmedetomidine did not cause neurological damage. By subarachnoid way the association of small drug doses (3-10 µg) with the anesthetic resulted in an increase in the time of sensory and motor block, maintaining hemodynamic stability and some degree of sedation. Studies on the effects of dexmedetomidine introduced into the subarachnoid space, besides scarce do not ensure that the agent does not cause neurological damage. **Objective:** to evaluate the effects of dexmedetomidine, administered by the intrathecal route in single dose, determines on the spinal cord and meninges of rabbits. **Method:** twenty young adult female rabbits, weighing 3200-4900 g with 36 spine length and 40 cm were divided by lot into two groups (G): 0.9% saline G1, G2 dexmedetomidine (10 µg). After intravenous anesthesia with ketamine and xylazine spinal puncture was performed in S1 - S2 ultrasound guided and injected a random solution. The animals remained in captivity for 21 days under medical observation and were sacrificed by decapitation and removal of the lumbosacral portion of the spinal cord for histologic examination [hematoxylin and eosin (HE)] and immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP). **Results:** no animal showed histological lesions of nerve tissue; however 9 animals showed changes in meninges. **Conclusions:** in this experimental model in rabbits dexmedetomidine triggered no histological lesions of nerve tissue, but showed changes in meninges.

Key words: dexmedetomidine, rabbits, intrathecal injection, meningeal toxicity

1 INTRODUÇÃO

A dexmedetomidina, enantiômero dextrógiro da medetomidina, é um agonista α_2 adrenérgico super-seletivo, apresentando relação de seletividade entre os receptores $\alpha_2: \alpha_1$ de 1600:1. Apresenta importantes ações sedativa e analgésica podendo reduzir em até 95% a concentração alveolar mínima (CAM) do halotano, resultados observados em estudo experimental¹. O efeito sedativo, mesmo em doses elevadas, não é acompanhado de depressão respiratória, sendo que o fármaco também possibilita que os pacientes sejam facilmente despertados, permanecendo cooperativos promovendo analgesia e sedação no período pós-operatório e na unidade de tratamento intensivo².

Os α_2 -agonistas foram sintetizados no início da década de 60 e utilizados, inicialmente, como descongestionantes nasais e, posteriormente, como agentes anti-hipertensivos³. Pesquisas subsequentes mostraram que esse grupo farmacológico apresentava ação ansiolítica e simpaticolítica⁴ podendo ser empregado com o objetivo de reduzir o consumo de anestésicos e opioides e diminuindo o risco de eventos cardiovasculares adversos no período perioperatório^{5,6}.

Com o desenvolvimento de agentes com maior especificidade pelos receptores α_2 -adrenérgicos, como a dexmedetomidina, que por apresentarem ação mais intensa sobre a vigília, proporcionar bom controle hemodinâmico desencadeado pelo estresse e produzir, por si só, anestesia⁷, tornaram-se nova opção de fármaco utilizado em Anestesiologia^{7,8}.

A dexmedetomidina é empregada como medicação pré-anestésica ou associada à anestesia pelas vias intravenosa^{9,10}, muscular⁹, peridural¹¹ ou subaracnoidea¹².

Os efeitos antinoceptivos dos agonistas α_2 ¹³ são decorrentes de ação nos adrenoceptores espinais. Como eles difundem-se pouco pela barreira hemato-encefálica,

promovem antinocicepção local efetiva no interior do sistema nervoso central após serem administrados pelas vias peridural e subaracnoidea, com efeitos colaterais mínimos¹⁴.

Está descrito que a dexmedetomidina injetada no espaço peridural é cinco vezes mais efetiva em produzir efeitos antinociceptivos do que aqueles produzidos após administração sistêmica¹⁵.

Quando introduzida no espaço peridural de seres humanos a dexmedetomidina não desencadeou lesões neurológicas¹⁶. Pela via subaracnoidea a associação de pequenas doses do fármaco (3-10 µg) com o anestésico resultou em aumento no tempo dos bloqueios sensitivo e motor^{17,18}, com manutenção da estabilidade hemodinâmica e algum grau de sedação¹⁹.

O mecanismo de ação pelo qual a administração subaracnoidea de agonistas α_2 adrenérgicos prolonga o bloqueio sensitivo e motor dos anestésicos locais não é conhecido. O anestésico local atua nos canais de sódio enquanto os agonistas α_2 atuam pela ligação nas fibras C pré-sinápticas e nos neurônios pós-sinápticos do corno dorsal. As ações analgésicas deste grupo de fármacos poderia ser decorrente da depressão da liberação de neurotransmissores da fibra C e da hiperpolarização dos neurônios do corno dorsal da medula²⁰. Como os mecanismos de ação dos anestésicos locais e α_2 agonistas são diferentes, quando ambos são utilizados em associação podem apresentar efeitos aditivos ou sinérgicos²¹.

Em ratos, o emprego da dexmedetomidina pela via subaracnoidea mostrou efeitos antinociceptivos importantes^{17,18}. Em ovelhas, nas quais foram administradas doses elevadas de dexmedetomidina (100 µg), não foram encontrados efeitos adversos

ou sinais de comprometimento neurológico após a observação clínica que durou período de 7 dias²².

Os estudos sobre os efeitos da dexmedetomidina introduzida no espaço subaracnoideo, além de escassos, não asseguram que o agente não causa lesões neurológicas. E, quando o fármaco foi administrado pela via peridural, por meio de cateter, em coelhos, associado ou não ao anestésico local, foram observadas lesões histológicas compatíveis com toxicidade do tecido nervoso, tanto no grupo que recebeu apenas anestésico local quanto naqueles que receberam a dexmedetomidina¹⁴.

Quando se propõe estudar neurotoxicidade, a seleção da espécie animal deve ser realizada com cuidado, especialmente se os resultados obtidos serão extrapolados para os seres humanos²³. Por exemplo, no rato o espaço subaracnoideo possui tamanho limitado, o que provoca menores diluições e misturas dos fármacos no líquido, favorecendo o maior contato da substância estudada com o tecido nervoso, podendo induzir resultados superestimados. Já o cão, cujo espaço subaracnoideo é comparável ao dos seres humanos, é uma boa espécie para estudar neurotoxicidade²⁴.

Coelhos são utilizados para o estudo de neurotoxicidade desde meados do século passado. Diversos autores pesquisaram, nesta espécie, os efeitos de anestésicos locais²⁵⁻²⁶, dos benzodiazepínicos^{27,28}, de anticolinesterásicos²⁸, de antagonistas do receptor N-metil-D-aspartato^{29,30}, dentre outras soluções³¹.

Na grande maioria destas pesquisas, a solução foi introduzida no espaço subaracnoideo por meio de cateter implantado de forma crônica^{23-26,28-31} e, em alguns estudos, foram observadas, nos animais do grupo controle, células inflamatórias nas meninges²⁹ e no tecido nervoso²⁹ ao redor do cateter. Também foram constatadas

alterações neuroimunes que se manifestaram pelo aumento de marcadores gliais e pela expressão de citocinas específicas³².

A presença de um cateter no espaço subaracnoide e o tempo de implantação do mesmo podem comprometer a administração do fármaco e as respostas desencadeadas pelo agente estudado^{33,34}. Somando-se a isto, a cateterização crônica do espaço subaracnoide e do peridural produz alterações histológicas no tecido nervoso medular, em torno do cateter^{35,36}. Alguns autores²⁹ afirmaram que estas alterações são facilmente distinguíveis daquelas determinadas pelos efeitos tóxicos das soluções estudadas e que a técnica de injeção subaracnoidea com punção única também induziu ao edema das raízes nervosas, em macacos³⁷.

Estudos experimentais utilizando a injeção subaracnoidea com punção única para a introdução subaracnoidea de soluções são aqueles cuja técnica mais se aproxima dos procedimentos anestésicos empregado na prática clínica.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos que a dexmedetomidina, administrada pela via subaracnoidea, em dose única, determina sobre a medula espinal e as meninges de coelhos.

3 MÉTODO

3.1 Animais utilizados

Após a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo CEEA 918/2012), foram utilizados 20 coelhos adultos jovens, fêmeas, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 3200 gramas e 4900 gramas e comprimento de coluna entre 36 e 40 centímetros, fornecidos pelo Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Na seleção dos animais foram excluídos aqueles que não apresentaram aspecto sadio e que tiveram necessidade de mais de uma punção subaracnoidea.

Os animais foram randomizados em dois grupos experimentais.

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos por lista gerada por computador e envelopes selados em dois grupos experimentais, com 10 animais em cada grupo, submetidos, inicialmente, à anestesia intravenosa com xilazina e cetamina e, em seguida, à punção subaracnoidea. Os grupos diferenciaram-se pelo tipo de solução administrada, ou seja:

Grupo 1 (G1) – solução fisiológica a 0,9%

Grupo 2 (G2) – dexmedetomidina (10 µg)

3.3 Sequência experimental

Em todos os animais foi realizada a sequência experimental que se segue:

- Jejum alimentar de 12 horas com livre acesso à água.
- Pesagem.

- Anestesia com xilazina e cetamina.
- Posicionamento do animal em decúbito ventral em mesa cirúrgica.
- Medida do comprimento da medula espinal.
- Limpeza local com água e sabão.
- Tricotomia.
- Limpeza do local com solução salina fisiológica estéril.
- Antissepsia com gluconato de clorexidina a 2%.
- Colocação de campo estéril.
- Palpação e identificação dos espaços intervertebrais.
- Punção subaracnoidea sob orientação de ultrassom.
- Injeção da solução sorteada.
- Retirada do animal da mesa.
- Observação clínica até recuperação da anestesia venosa.
- Manutenção em cativeiro durante 21 dias sob observação clínica.
- Sacrifício do animal.
- Remoção da medula espinal em sua porção lombar e sacral.
- Fixação da peça anatômica.
- Análise da histologia

3.4 Técnicas utilizadas

3.4.1 Preparo do animal

Após período de jejum de 12 horas com livre acesso à água, os animais foram pesados e anestesiados com injeção intravenosa de cloridrato de xilazina, na dose de 3 mg.kg⁻¹ de peso corporal, e cloridrato de cetamina, na dose de 10 mg.kg⁻¹ de peso corporal.

Após a anestesia venosa, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica e obtido o comprimento da medula espinal, medida pela distância entre a base do crânio e o espaço lombossacral²⁵.

Foi realizada a limpeza da pele e pêlos da região da coluna vertebral com água e sabão seguida de tricotomia em área de 10 cm ao redor do local onde foi realizada a punção, correspondente ao espaço intervertebral S1 – S2. Esta região foi lavada com solução fisiológica a 0,9% e, após a antissepsia com solução tópica de gluconato de clorexidina a 2%, foram colocados os campos estéreis.

3.5 Punção subaracnoidea

3.5.1 Técnica de punção

No coelho o espaço mais caudal que permite a abordagem do espaço subaracnoideo se encontra entre as vértebras S1 e S2. Para a identificação deste espaço e a determinação do local da punção subaracnóidea, palpam-se as cristas ilíacas e se identifica o processo espinhoso da primeira vértebra sacral deslizando-se o dedo 1,5 cm

a 2 cm em direção caudal. O espaço S1-S2 se localiza 1 cm caudal ao processo espinhoso da primeira vértebra sacral²⁵.

O bloqueio subaracnoideo foi guiado com auxílio da ultrassonografia, utilizando o aparelho da marca SonoSite (USA), modelo M-turbo, que possui o recurso de Doppler tecidual de parede (TDI). Foi utilizado o transdutor micro-linear com frequência de 6.0 a 13 MHz

A punção subaracnoidea foi realizada com agulha de Quincke de calibre 25G x 50 mm, por acesso mediano, com ângulo de inclinação de aproximadamente 45°. A agulha foi introduzida lentamente, em direção cefálica, guiada por ultrassom, até penetrar o espaço subaracnoideo.

Após a identificação do espaço, os animais de G1 e G2 receberam as soluções correspondentes. Foram registradas as dificuldades na realização da punção.

3.5.2 *Volume injetado*

Foram administrados 5 µL por centímetro de medula espinal (0,2 mL)²⁵, injetados em 1 segundo, em seringa de 1 mL, descartável.

3.5.3 *Solução administrada*

A solução fisiológica 0,9% (Grupo 1) foi sintetizada pela indústria farmacêutica Hipolabor e o cloridrato de dexmedetomidina (Precedex[®]) sem conservante em 10 µg (Grupo 2) sintetizada pela indústria farmacêutica Abbott, foram as soluções utilizadas.

3.6 Observação clínica

Após a punção subaracnoidea ou a injeção da solução sorteada, os animais foram retirados da mesa cirúrgica e, quando recuperados da anestesia intravenosa, foram avaliados clinicamente quanto à motricidade e à sensibilidade dolorosa. A motricidade foi avaliada pela observação clínica, baseado no critério estabelecido por Drummond e Moore³⁸, ou seja: 0 - movimento livre das extremidades inferiores; 1 - assimetria e limitação para sustentar o corpo e para deambular por alteração nas extremidades inferiores; 2 - inabilidade para sustentar o corpo pelas extremidades inferiores; 3 - paralisia das extremidades inferiores. Na sequência, foi avaliada a sensibilidade dolorosa por meio de preensão nas extremidades inferiores e superiores, bem como da pele nas regiões dos dermatomos sacrais, lombares, torácicos e na orelha, com auxílio de pinça dente de rato.

Os animais permaneceram em cativeiro durante 21 dias, sob observação clínica. Foram verificadas as alterações de motricidade baseadas no critério de Drummond e Moore³⁸. A sensibilidade dolorosa foi avaliada pela observação dos seguintes sinais indicativos de dor: retração da pata, mudança de postura e gemência após a aplicação dos estímulos dolorosos descritos acima.

3.7 Sacrifício

O sacrifício foi realizado por decapitação, após anestesia prévia com xilazina e cetamina pela via intravenosa. A porção lombar e sacral da medula espinal e as raí es da cauda equina foram retiradas em tempo inferior a três minutos, para minimizar os riscos de lesão tecidual desencadeada por isquemia e apoptose. O tecido

medular, as raízes e as meninges foram fixadas em solução de formalina a 10% para posterior exame histológico e imuno-histoquímico.

3.8 Exame histológico

As peças anatômicas permaneceram, durante sete dias, em solução de formalina. Os cortes transversais do tecido nervoso e das meninges se iniciaram, aproximadamente, dez centímetros acima do local onde foi realizada a punção subaracnoidea, estendendo-se até o final da cauda equina, em intervalos de meio centímetro. Os cortes dos tecidos foram colocados em blocos de parafina e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) e de imuno-histoquímica pelo marcador glial - proteína ácida glial fibrilar (GFAP)⁴²⁻⁴⁵.

3.8.1 Técnica imuno-histoquímica para GFAP

A realização da técnica de imuno-histoquímica para GFAP as amostras incluídas em parafina foram seccionadas na espessura de três micra em micrótomo rotativo e estendidas em lâminas histológicas de vidro previamente tratadas com organo-silano. Depois de permanecerem por 18 horas em estufa a 58°C, os cortes passaram pelo processo de desparafinização em três cubas com xilol no tempo de cinco minutos em cada cuba, então por quatro cubas de etanol absoluto e também por cinco minutos em cada uma delas, hidratação em água corrente e destilada.

A próxima etapa realizada foi o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos em temperatura ambiente e, após as lâminas serem lavadas em água destilada, os cortes

foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor em panela pressurizada Pascal (Dako) por três minutos em temperatura de 117°C em solução Trilogy (Cell Marque).

Seguindo-se a lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas foram transferidas para bandejas especiais para imuno-histoquímica, sendo os cortes cobertos por PBS (solução salina tamponada pH 7.2 – 7.4) e depois de retirado o excesso desta solução, receberam o anticorpo primário GFAP, clone 6F2 (Dako) previamente diluído a 1:400, permanecendo assim incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram retirados por meio de lavagem em PBS e incubados com o anticorpo secundário e o terciário Hides Polímero (Cell Marque) durante 10 minutos, cada uma das incubações, em temperatura ambiente.

Os cortes novamente lavados em PBS foram revelados pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina (Cell Marque) e, após a revelação, foram lavados em água corrente e contra corados em hematoxilina segundo Harris (MERCK) por um minuto. Os cortes então passaram pelo processo de desidratação em quatro cubas com etanol absoluto e diafanização em três cubas com xilol. Por fim as lâminas foram montadas com lamínulas 24x32 (KNITTEL) por meio de resina sintética Permount (FISHER – SP 15-500) e lidas em microscópio óptico.

O exame histológico das lâminas foi realizado pela microscopia óptica. Os resultados obtidos pela análise dos cortes do tecido nervoso e das meninges corados pelo HE foram classificados como normais, quando não apresentaram alterações, ou lesados, determinando-se os achados observados, de acordo com os seguintes critérios:

- Tipo de lesão
 - 1 - aracnoidite
 - 2 - aracnoidite + lesão nervosa

3 - lesão nervosa

- Localização da lesão

1 - região posterior (P)

2 - região lateral (L)

3 - região anterior (A)

4 - P+L

5 - L+A

6 - P+L+A

- Extensão da lesão

1 - <10%

2 - 10% - 50%

3 - >50%;

- Profundidade da lesão

1 - substância branca

2 - substância cinzenta

3 - substâncias branca e cinzenta

- Vaso sanguíneo

1 - normal

2 - espessamento fibroso

3 - trombose

Na presença de aracnoidite adesiva:

- Aderência

0 - ausente

1 - dura mater (D) + aracnóide (A)

2 - A+pia máter (P)

3 - D+A+P

- Espessamento de meninge

0 - ausente

1 - leve

2 - moderado

3 - intenso

- Infiltrado linfoplasmocitário

0 - ausente

1 - leve

2 - moderado

3 - intenso

- Fibrose

0 - ausente

1 - leve

2 - moderada

3 - intensa

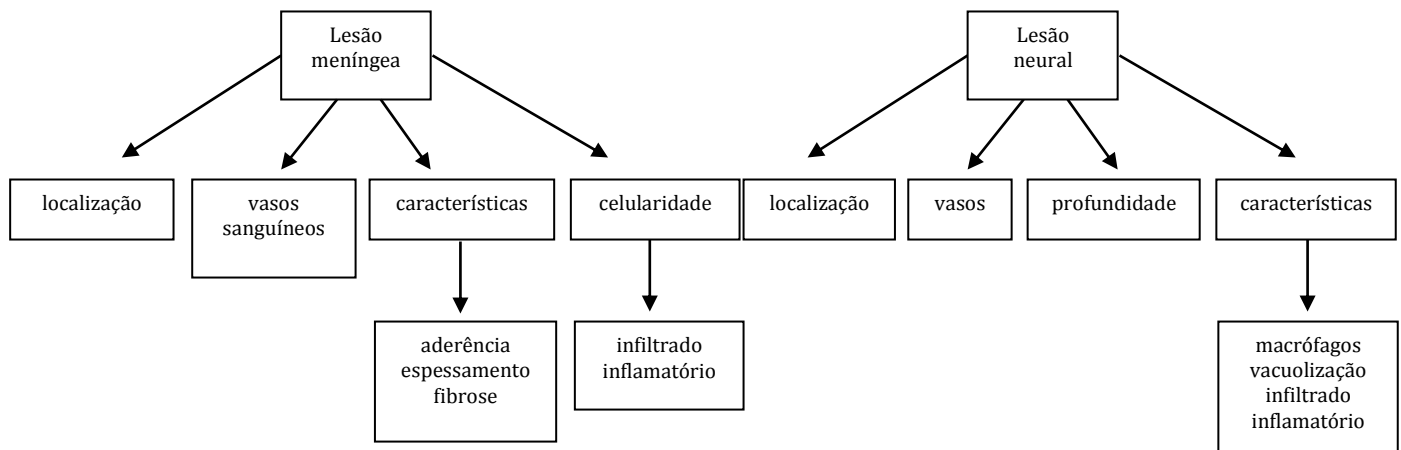
Na presença de lesão de nervo

1 - vacuolização

2 - infiltrado linfoplasmocitário

3 - macrófagos

A avaliação dos resultados histológicos foi encoberta, realizada por três pesquisadores envolvidos no estudo.



Organograma da avaliação histológica

Para análise aprofundada da celularidade medular foi estimada a porcentagem de células a partir da avaliação da área imuno-histologicamente marcada pelo GFAP nos cornos dorsais e ventrais da medula (Figura 1). Para tanto os cortes histológicos corados pelo GFAP, após serem fotografados em resolução 1090 x 650 tipo JPG, 96 dpi, 24 bits de cor, captada em microscópio Pannoramic MIDI 3DHISTECH, sob objetiva 200x foram submetidos ao processamento digital segundo algoritmo abaixo (Quadro 1), empregando o software Image J 1.46 e o *plugin* “Color Deconvolution”.



Figura 1 - Segmento da região posterior da medula espinal. GFAP 40x. Exemplo de área utilizada para estimar o percentual de células marcadas.

Quadro 1 - Algoritmo de processamento das imagens para quantificação imuno-histoquímica

```

macro [1]" {
run("Colour Deconvolution", "vectors=[H&E DAB]");
}
macro [2]" {
run("Crop");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
run("Make Binary");
run("Measure");
run("Open Next");
}
macro [3]" {
selectImage(1);
run("Close");
selectImage(1);
run("Close");
selectImage(1);
run("Close");
selectImage(1);
run("Close");
run("Open Next");
}

```

As imagens foram, inicialmente, separadas por seus vetores componentes da hematoxilina e DAB pelo *plugin* “Color deconvolution” (H-DAB). Após isso, foi selecionada uma área retangular do tecido e realizado o aumento do contraste, de forma padronizada, para a binarização da imagem.

Foi avaliado o percentual da área da imagem binarizada equivalente aos pixels do tecido marcado pelo DAB (Figura 2), e comparadas as amostras entre os grupos³⁹⁻⁴¹.

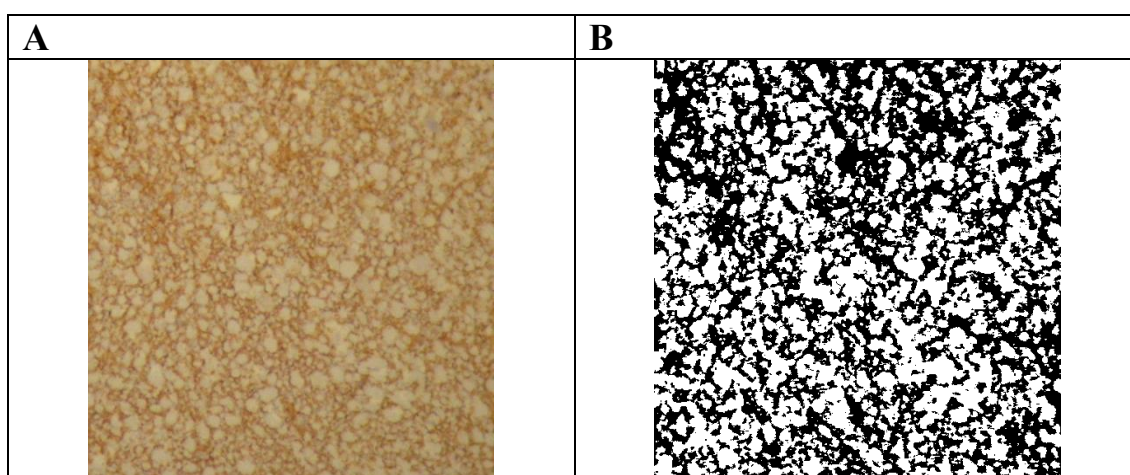


Figura 2 - A. Área selecionada do tecido neural. B. Área binarizada após o processamento da imagem, resultando em 45% do tecido marcado.

3.9 Comissão de Ética em Experimentação em Animal

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (protocolo CEEA 918/2012).

3.10 Modelo de estudo

Este estudo foi controlado e randomizado. A análise histológica dos resultados foi encoberta.

Os grupos foram randomizados a partir de lista gerada por computador e por envelopes selados. A preparação das soluções administradas nos animais de G1 e G2 foi realizada por pesquisador não envolvido diretamente na realização da técnica.

3.11 Método estatístico

Tendo como objetivo avaliar a homogeneidade dos grupos com relação ao peso, ao comprimento da medula espinal e ao volume da solução administrada no espaço subaracnoideo, foi realizado, como método estatístico, o teste t de Student (resultados expressos em média e desvio padrão), e para comparar os resultados dos percentuais das marcações histológicas das células pelo método do GFAP o teste não paramétrico de Mann-Whitney (resultados apresentados em mediana e 1º e 3º quartis) sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

Pressupondo-se uma estimativa de taxa de lesão do tecido nervoso de 70% e de taxa induzida de 1%⁵⁴ para a solução fisiológica, para um valor α de significância de 5% (limite para detecção de erro tipo I) e um poder de 95%, foram necessários oito animais por grupo.

4 RESULTADOS

Os dois grupos foram homogêneos quanto ao peso ($p=0,28$) e ao comprimento da medula espinal ($p=0,23$) (Tabela 1).

Não houve dificuldade na identificação e na abordagem do espaço subaracnoideo em nenhum animal.

Todos os animais permaneceram clinicamente normais durante o período de cativeiro.

Não foram encontradas alterações histológicas no tecido nervoso e nas meninges dos animais pertencentes ao G1 (Figuras 3 e 4).

Em nove coelhos do G2 foram encontradas alterações histológicas nas meninges, em áreas focais (inferiores a 5%). Não houve alterações histológicas no tecido nervoso (Tabela 2; Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos quanto à quantificação do marcador imuno-histoquímico ($p=0,05$) (GFAP). O *box-plot* da média e desvio padrão dos valores de marcação do GFAP estão representados na figura 11.

Tabela 1 – Peso (g) e comprimento de medula espinal (cm). Valores expressos em média \pm desvio padrão (dp).

	G1	G2	ESTATÍSTICA
Peso (g)	4,1 \pm 0,44	4,3 \pm 0,37	p = 0,28
C medula (cm)	39,2 \pm 1,4	39,8 \pm 0,37	p = 0,23

C medula– comprimento de medula espinal.

Tabela 2 - Resultados histológicos do tecido nervoso e das meninges dos animais pertencentes ao G2. (Porcentagem do campo histológico comprometido)

C	T N	MENINGES
1	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular focal na pia-máter e aracnóide (<5%),
2	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular focal na pia-máter e aracnóide (<5)
3	normal	normal
4	normal	aracnoide com espessamento discreto aderida à dura-máter (<5)
5	normal	áreas focais de infiltrado inflamatóriolinfoplasmocitário com adesão da pia-máter na aracnoide (<5)
6	normal	discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário da pia-máter e aracnoide com áreas focais de adesão (<5)
7	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular com áreas de espessamento da pia-máter e aracnoide (<5%)
8	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular focal na pia-máter e aracnoide (<5)
9	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular focal na pia-máter e aracnoide (<5)
10	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular focal na pia-máter e aracnoide (<5)

C – coelho, TN – tecido nervoso

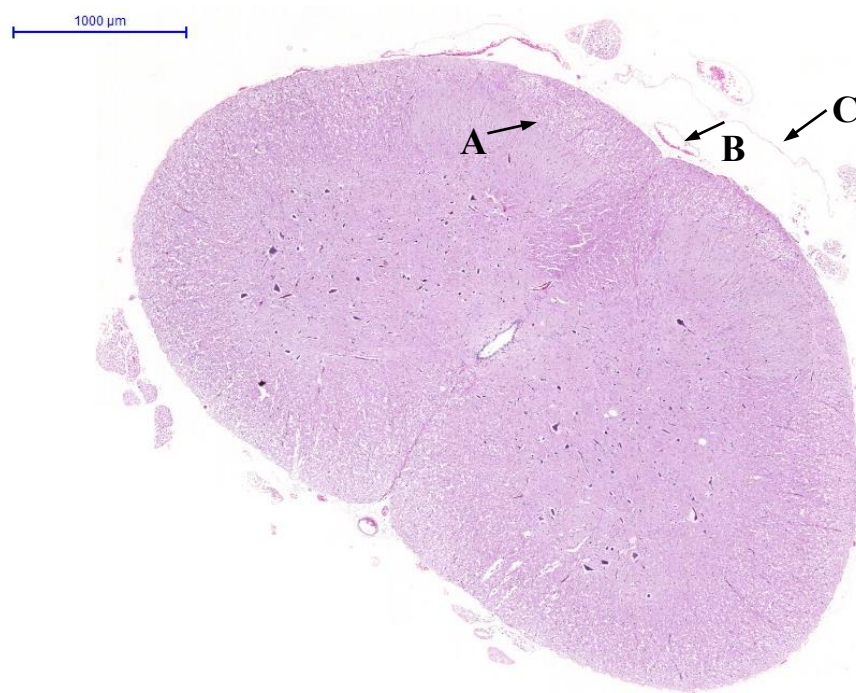


Figura 3 - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de animal do G1 (C5). H&E 2×.

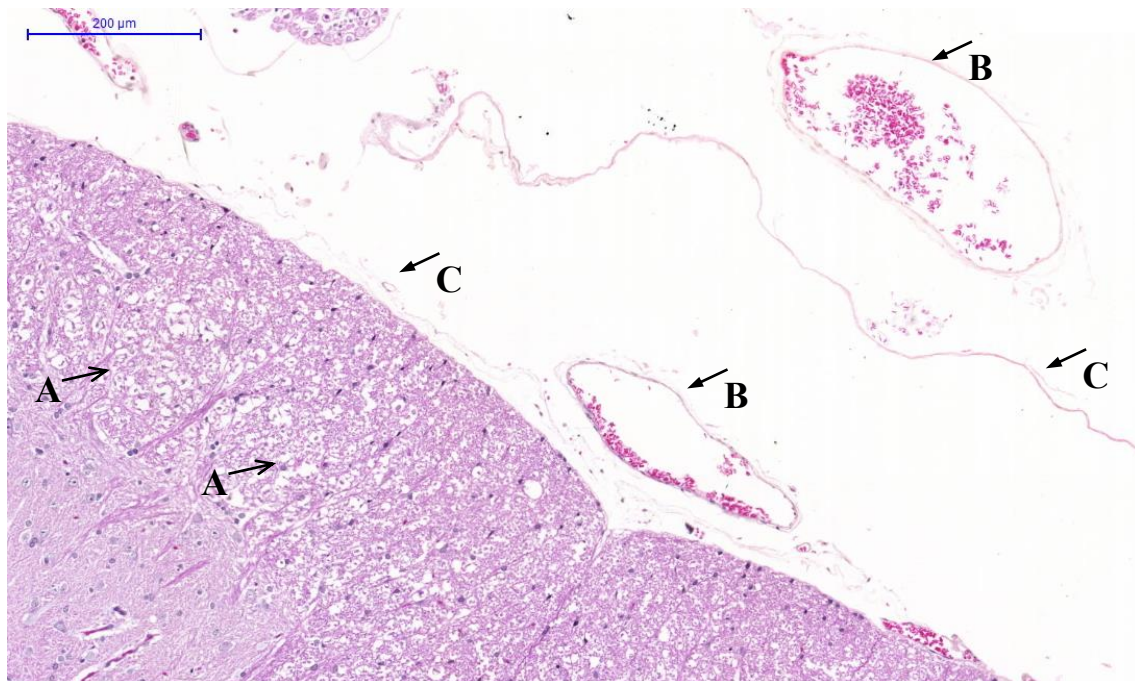


Figura 4 - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de animal do G1 (C5). H&E 10×.

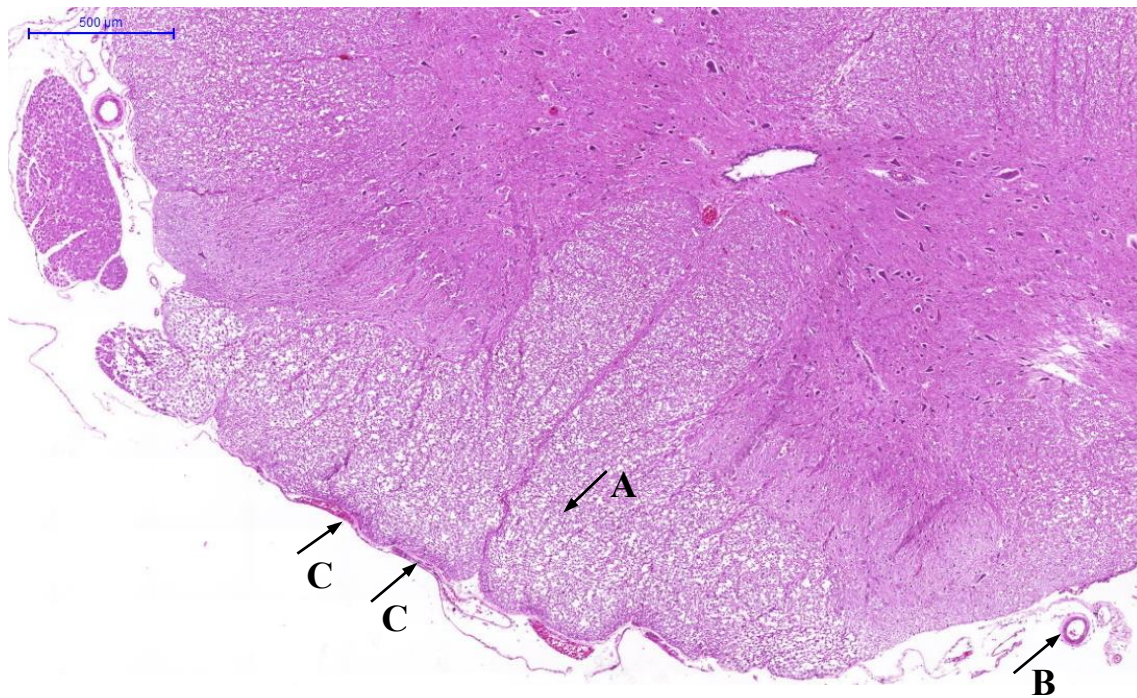


Figura 5 - Tecido nervoso normal (A), vasos sanguíneos normais (B) e discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário entre na pia-máter e aracnoide com áreas focais de adesão (C) de animal do G2 (C6). H&E 3,5×.

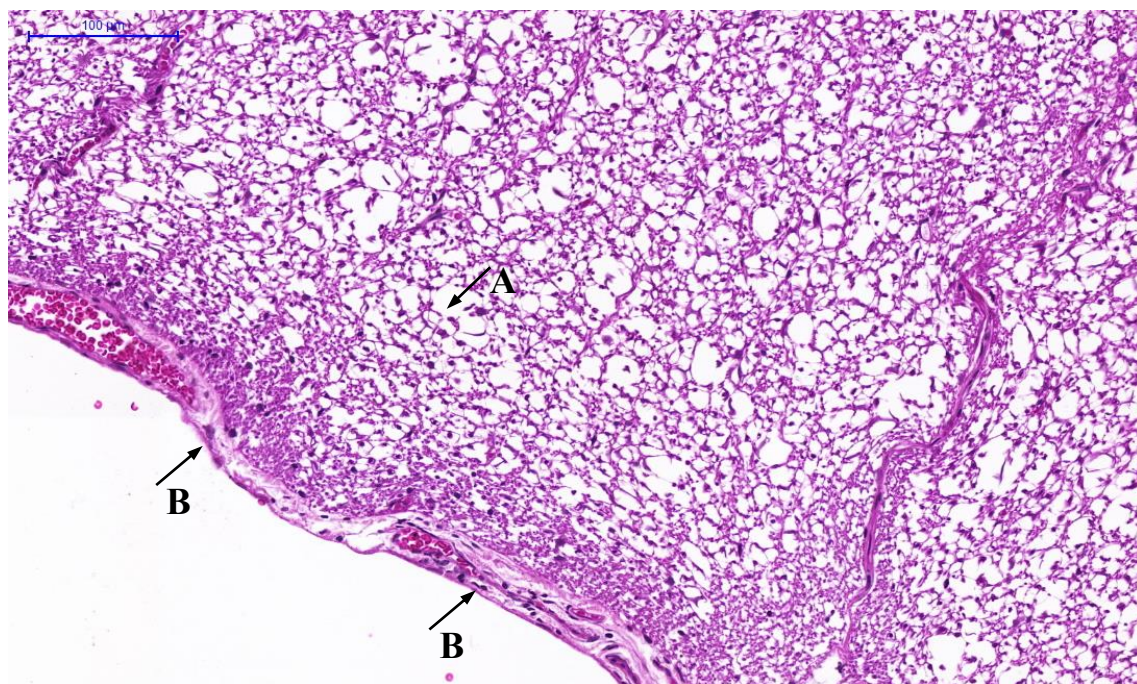


Figura 6 - Tecido nervoso normal (A) e discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário entre na pia-máter e aracnoide com áreas focais de adesão (B) de animal do G2 (C6). H&E 18×.

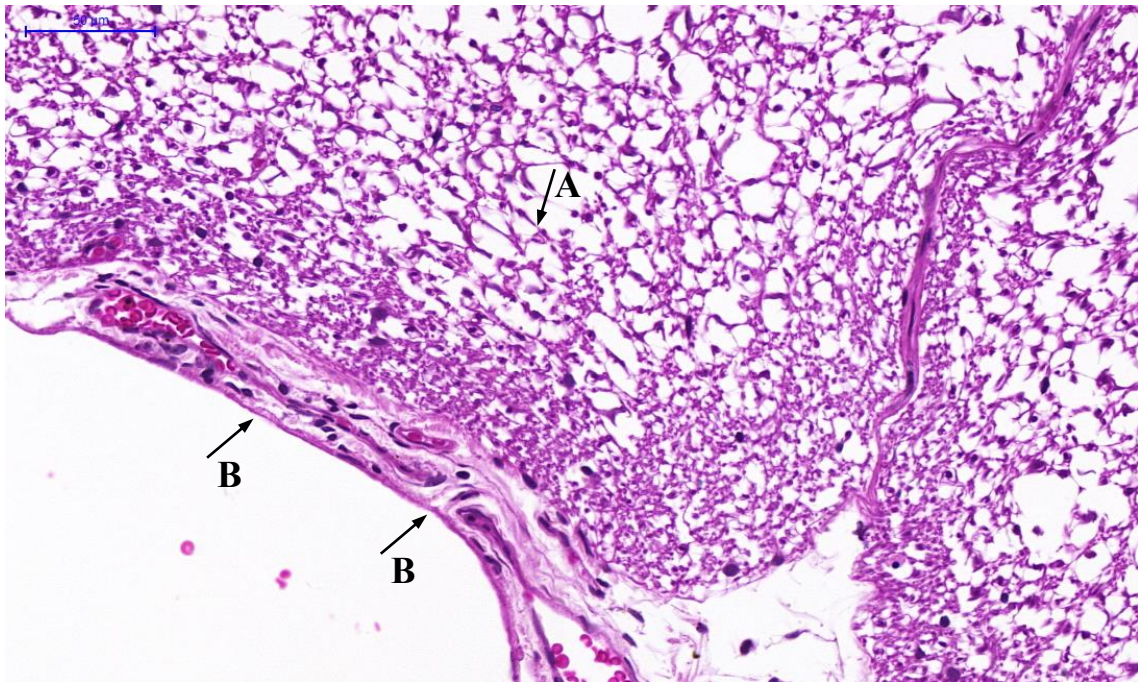


Figura 7 - Tecido nervoso normal (A) e discreto infiltrado inflamatório linfoplasmocitário entre na pia-máter e aracnoide com áreas focais de adesão (B) de animal do G2 (C6). H&E 30×.



Figura 8 - Tecido nervoso normal (A), infiltrado linfoplasmocitário perivascular com áreas de espessamento da pia-mater e da aracnoide (B e C) de animal do G2 (C7). H&E 6×.

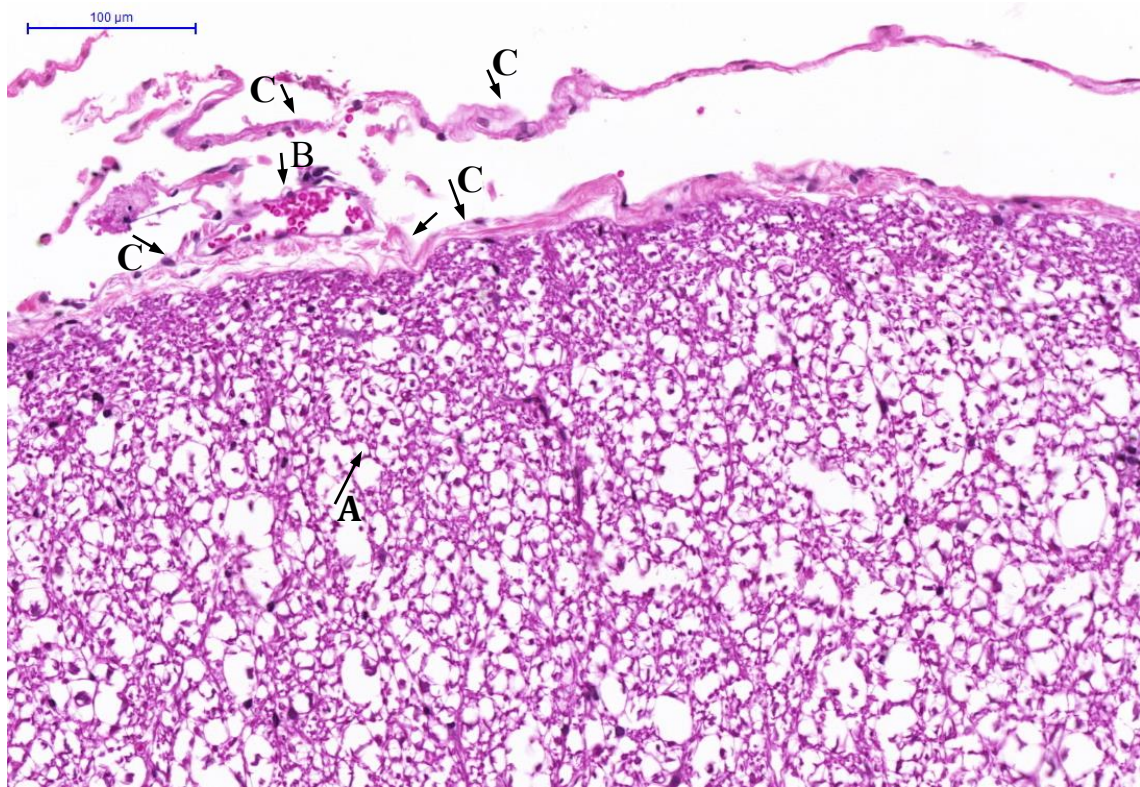


Figura 9 - Tecido nervoso normal (A), infiltrado linfoplasmocitário perivascular com áreas de espessamento da pia-mater e da aracnoide (B e C) de animal do G2 (C7). H&E 20×.

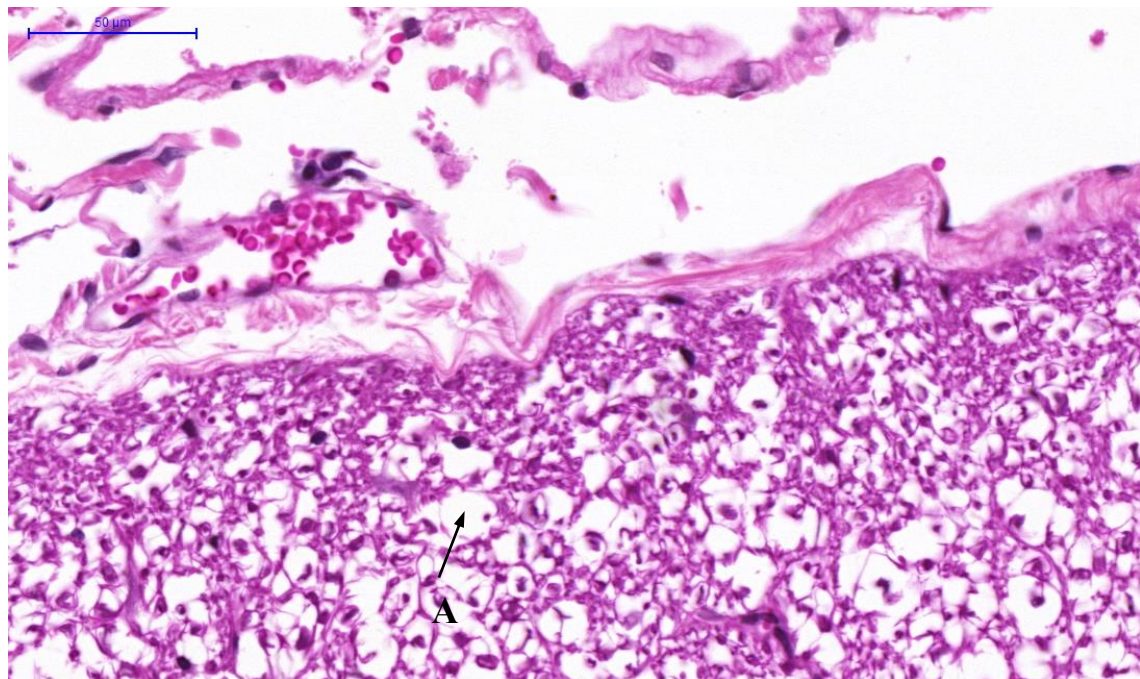


Figura 10 - Tecido nervoso normal (A), infiltrado linfoplasmocitário perivascular com áreas de espessamento da pia-mater e da aracnoide (B e C) de animal do G2 (C7). H&E 40×.

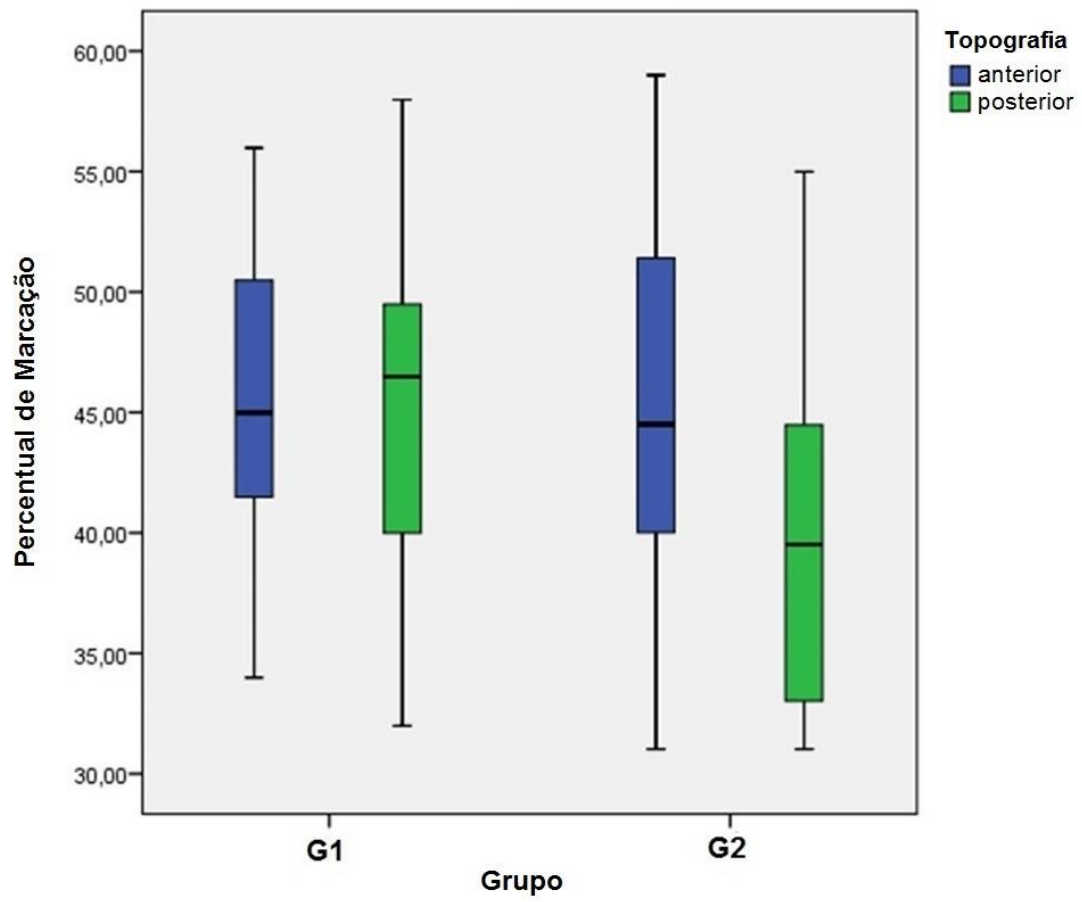


Figura 11 - *Box-Plot* da mediana e 1º e 3º quartis do percentual das células do tecido nervoso marcadas pelo GFAP dos grupos estudados.

5 DISCUSSÃO

5.1 Discussão da metodologia

5.1.1 Ultrassonografia como guia de punção

Em modelos experimentais com objetivo de estudar alterações que soluções introduzidas no espaço subaracnóideo determinam sobre o tecido nervoso e as meninges é importante excluir a possibilidade de a punção subaracnoidea ser o fator determinante de lesões. Citam-se como exemplo lesões consequentes ao trauma desencadeado pela agulha utilizada na punção e administração de soluções no interior da raiz nervosa.

Em duas pesquisas realizadas em coelhos^{25,43}, nos quais os fármacos foram administrados no espaço subaracnoideo com punção única, não foram observadas, à microscopia óptica, alterações histológicas do tecido nervoso medular da maioria dos animais que receberam solução fisiológica (doze coelhos). Em apenas um deles foi constatada laceração intensa da medula espinhal no local da punção⁴³, que foi realizada entre a última vértebra lombar e a primeira vértebra sacral.

Ready et al²⁵ descreveram que, no coelho, o espaço subaracnoideo pode ser abordado entre a primeira e a segunda vértebras sacrais, pela via paramediana, e que o volume do líquido é pequeno e não refluíu através do canhão da agulha. Para diminuir a manipulação da agulha e a possibilidade de trauma do tecido nervoso desencadeado pela punção, o espaço subaracnoideo foi identificado com auxílio de estimulador de nervo periférico.

Estudo anatômico do sistema nervoso central do coelho (*Oryctolagus cuniculus*) mostra que o comprimento do cone medular pode estender-se da segunda à quarta vértebra sacral⁴⁴.

Quando se pretende estudar neurotoxicidade em animais vivos, a identificação e o posicionamento corretos da agulha, no espaço subaracnoideo, são fundamentais para que haja confiabilidade nos resultados obtidos. Tal fato exclui a possibilidade de que o trauma do tecido nervoso, a lesão dos vasos sanguíneos e a injeção intraneural da solução sejam os responsáveis pela agressão ao tecido nervoso.

A utilização do ultrassom em anestesia regional facilitou a realização da técnica anestésica, permitindo a melhor visibilidade das estruturas a serem abordadas (nervos), assim como das adjacentes (vasos sanguíneos, pulmão, pleura). Possibilitou o posicionamento adequado da agulha, evitando-se lesão de nervo e injeção intravascular de anestésico local, além de possibilitar a observação da área de dispersão da solução injetada⁴⁵.

Assim sendo, na presente pesquisa, a utilização do ultrassom como guia de punção permitiu a visibilização do espaço subaracnoideo e a dispersão da solução administrada no interior deste espaço, mostrando que técnica para a realização da punção não foi o fator que determinaria possíveis alterações no tecido nervoso da medula e nas meninges.

5.1.2 Grupos experimentais

O grupo 1, que recebeu a solução salina por via subaracnoidea, teve por finalidade estudar os efeitos que o volume de solução administrada determinaria sobre o tecido nervoso.

Como o espaço subaracnoideo do coelho, no local onde foi realizada a punção, que é o mais caudal que permite a passagem da agulha, é pequeno, visto que ainda contém o tecido medular⁴⁴, era imperativo que o volume da solução administrada

não fosse o fator desencadeador de lesões nervosas. Alguns autores aventaram a hipótese de que aumentos agudos no volume do líquido poderiam levar ao aumento na pressão líquórica, comprometer o fluxo sanguíneo medular e causar isquemia medular com o surgimento de lesões neurológicas⁴⁶. Somando-se ao que já foi descrito, este grupo serviu, também, para excluir eventual injeção intraneural da solução. Está descrito, na literatura, que a injeção de solução salina, em volume de 0,05 mL, no interior dos fascículos de nervos periféricos de coelhos foi suficiente para degenerar os axônios^{47,48}.

Já o grupo 2, que recebeu a dexmedetomidina, teve por objetivo avaliar os efeitos que o fármaco determinaria sobre o tecido nervoso.

5.1.3 GFAP

A ativação glial é muito estudada em decorrência de seu papel na lesão e reparação do sistema nervoso central (SNC). Há muito se reconhece que a resposta microglial a quase todas as formas de lesão do SNC pode ser considerada como um dos primeiros indicadores da doença latente. A ativação microglial envolve um padrão estereotipado de respostas celulares que incluem proliferação, recrutamento no local da lesão e aumento da expressão de imunomoléculas⁴⁹. Os astrócitos estão entre as primeiras células que respondem à lesão do SNC. A hipertrofia e, em menor extensão, a proliferação de astrócitos são as primeiras respostas observadas. Os astrócitos aumentam de tamanho porque contêm grandes quantidades de organelas citoplasmáticas e, em particular, grandes quantidades de GFAP⁵⁰.

Existem evidências de que a microglia pode contribuir diretamente para ou exacerbar a degeneração neuronal^{51,52}. Assim sendo, a dosagem do GFAP serviu de marcador precoce da lesão neural³².

5.1.4 Tempo de observação clínica no cativeiro

O tempo de observação clínica prolongada (21 dias) teve por objetivo avaliar os efeitos tardios que a dexmedetomida poderia desencadear também sobre as meninges, visto que resultados de pesquisas anteriores, realizadas em cães, demonstraram que, quando o fármaco agride primariamente o tecido nervoso, as alterações clínicas e histológicas são detectadas imediatamente após a administração do agente^{42,53,54} porém, para detecção de lesões nas meninges, é necessário tempo maior para que a inflamação e a aderência entre as meninges ocorram⁵⁵⁻⁵⁷.

5.1.5 Dexmedetomidina

A dexmedetomidina, agonista superseletivo dos receptores adrenérgicos α_2 , possui efeitos sedativos e analgésicos^{2,58}. Seus efeitos analgésicos são obtidos pela ativação dos receptores α_2A do corno dorsal da medula^{4,19,59}. Os neurônios da superfície do corno dorsal da medula, especialmente de lâmina II (substância gelatinosa), apresentam papel importante na modulação da transmissão nociceptiva porque recebem fibras aferentes primárias mielinizadas A δ e amielínicas C que carregam informações nociceptivas da periferia para o sistema nervoso central⁶⁰.

A administração subaracnoidea de dexmedetomidina inibe as respostas evocadas pelas fibras C e lentifica o potencial de ação das raízes ventrais dos neurônios do corno dorsal da medula⁶¹. O fármaco exerce antinocicepção espinal pela liberação de noradrenalina que, atuando nos receptores α_2A na membrana pré- e pós-sináptica

aumenta os níveis de noradrenalina no liquor e induz a liberação de acetilcolina e óxido nítrico^{62,63}.

Estudo “in vitro” utilizando a substância gelatinosa dos neurônios da medula espinal de ratos mostrou que a dexmedetomidina hiperpolariza o potencial de ação dos neurônios do corno dorsal por meio da ativação dos canais de potássio mediados pela proteína G nos receptores adrenérgicos⁶⁴.

Em modelos experimentais de isquemia cerebral^{65,66} o fármaco apresentou efeitos neuroprotetores mediados pela ativação de subtipos dos receptores α_2 ⁶⁶. Em decorrência destes efeitos especulou-se que a utilização da dexmedetomidina pelas vias peridural e subaracnoidea poderia ser segura, desprovida de efeitos deletérios sobre o tecido nervoso.

Quando administrada pela via subaracnoidea em animais a dexmedetomidina mostrou ser agente antinociceptivo potente⁶⁷. Por ser altamente lipofílica liga-se mais eficientemente aos neurônios do corno da medula espinal²². A lipofilicidade está relacionada à potência dos fármacos administrados no espaço subaracnoideo e a potência à toxicidade²².

O fármaco (Precedex[®]) é sintetizado como solução isotônica, límpida, com pH entre 4,5 e 7,0. Cada mililitro do Precedex[®] contém 118 μg de cloridrato de dexmedetomidina (equivalente a 100 μg de dexmedetomidina) e 9 mg de cloreto de sódio em água. A solução é livre de preservativos e não contém aditivos ou estabilizantes químicos¹⁴.

E, embora dexmedetomidina esteja sendo utilizada como adjuvante do anestésico local na anestesia subaracnoidea¹⁷⁻¹⁹, a sua apresentação farmacológica não foi preparada para ser empregada no neuroeixo.

5.2 Discussão dos resultados

Estudos experimentais abordaram os efeitos antinociceptivos da dexmedetomidina, contudo pouco foi publicado sobre os efeitos sobre o tecido nervoso e as meninges¹⁴. Konakci et al.¹⁴ estudaram os efeitos da administração peridural da dexmedetomidina associada ou não à lidocaína em coelhos e observaram lesões isquêmicas e edema leve e difuso da substância branca com ambas as drogas assim como naqueles em que houve a associação entre elas, porém a desmielinização de oligodendrócitos foi, somente, observada nos animais tratados com a dexmedetomidina.

Já Hou et al.⁶⁸ investigaram os efeitos de diferentes doses de dexmedetomidina introduzidas no espaço subaracnoideo de ratos e observou que somente em doses elevadas ($3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) houve sinais de lesão neural, avaliada pelo aumento na expressão de C Fos no corno dorsal, cujo aumento indica lesão da medula espinal⁶³.

Na presente pesquisa, na qual utilizamos a dose de $10 \mu\text{g}$ pela via subaracnoidea, dose que promove efeito antinociceptivo intenso e prolongado⁶⁷, pode-se observar lesões inflamatórias focais da aracnoide e da pia mater com áreas de adesão entre elas, alterações ausentes no grupo controle mostrando que de alguma forma o fármaco comprometeu as meninges.

As alterações encontradas nas meninges são semelhantes às da fase inicial da aracnoidite adesiva, ou seja, reação inflamatória da pia e aracnoide associado ao edema e à hiperemia das raízes nervosas. Mais tardiamente as faixas de colágeno começam a se formar entre a pia mater, a aracnoide e as raízes nervosas, culminando com a aderência entre estas estruturas. Nesta fase o edema das raízes começa a diminuir⁴.

Muitas são as possíveis causas de aracnoidite adesiva, dentre elas a presença de preservativos na solução, porém o fármaco utilizado na presente pesquisa (Precedex[®]) não possui preservativos. Desta forma parece ser a dexmedetomidina o fator desencadeante das lesões.

Na presente pesquisa não foram encontradas alterações histológicas do tecido nervoso da medula e das raízes pelo método H&E, e também não houve aumento do marcador glial (GFAP) nos animais do grupo tratados com dexmedetomidina. Este fato vem demonstrar que o foco inicial de agressão não foi o tecido nervoso, mas sim nas meninges.

Entretanto, outros estudos experimentais em outras espécies e doses devem ser realizados para melhor elucidar os efeitos do fármaco quando administrado no neuroeixo.

6 CONCLUSÃO

Neste modelo experimental, a dexmedetomidina administrada no espaço subaracnóideo, em dose única, desencadeou alterações histológicas em meninges, mas não no tecido nervoso de coelhos.

7 REFERÊNCIAS

1. Vickery RG, Sheridan BC, Segal IS, Maze M. Anesthetic and hemodynamic effects of stereoisomers of medetomidine, an α_2 -adrenergic agonist, in halothane-anesthetized dogs. *Anesth Analg*. 1988 Jul;67:611-5.
2. Venn RM, Bradshaw CJ, Spencer R, Brealey D, Caudwell E, Naughton C et al. Preliminary UK experience of dexmedetomidine, a novel agent for postoperative sedation in the intensive care unit. *Anaesthesia*, 1999 Dez;54(12):1136-42.
3. Jones MEP, Maze M. Can we characterize the central nervous system action of α_2 -adrenergic agonists? *Br J Anaesth*. 2001 Jan;86(1):1-3.
4. Kamibayashi T, Maze M. Clinical uses of α_2 -adrenergic agonists. *Anesthesiology*. 2000 Nov;93(5):1345-9.
5. Oliver M, Goldman L, Julian D, Holme I. Effect of mivazerol on perioperative cardiac complications during non-cardiac surgery in patients with coronary heart disease: the European Mivazerol Trial (EMIT). *Anesthesiology*. 1999 Oct;9(4):951-61.
6. McSPI Europe Research Group. Perioperative sympatholysis: beneficial effects of the alpha-2 adrenoceptor agonist mivazerol on hemodynamic stability and myocardial ischemia. *Anesthesiology*. 1997 Feb;86:346-63.
7. Tonner PH, Scholz J, Koch C, Schulte am Esch J. The anesthetic effect of dexmedetomidine does not adhere to the Meyer-Overton Rule but is reversed by hydrostatic pressure. *Anesth Analg*. 1997 Mar;84:618-22.
8. Tonner PH, Scholz J. Clinical perspectives of alpha-2 adrenoceptor agonists. *Curr Opin Anaesthesiol*. 1996;9:471-80.
9. Dyck JB, Maze M, Haack C, Vuorilehto L, Shafer SL. The pharmacokinetics and hemodynamic effects of intravenous and intramuscular dexmedetomidine hydrochloride in adult human volunteers. *Anesthesiology*. 1993 May;78:813-20.
10. Ebert TJ, Hall JE, Barney JA, Uhrich TD, Colinco MD. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. *Anesthesiology*. 2000 Aug;93:382-94.
11. Fukushima K, Nishimi Y, Mori K. The effect of epidural administered dexmedetomidine on central and peripheral nervous system in man. *Anesth Analg*. 1997;84:292S.
12. Al-Mustafa MM, Abu-Halaweh SA, Aloweidi AS, Murshidi MM, Ammari BA, Awwad ZM et al. Effect of dexmedetomidine added to spinal bupivacaine for urological procedures. *Saudi Med J*. 2009 Mar;30: 365-70.
13. Yaksh TL. Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate nociceptive processing. *Pharmacol Biochem Behav*. 1985 May;22:845-58.

14. Konakci S, Adanir T, Yilmaz G, Rezandko T. The efficacy and neurotoxicity of dexmedetomidine administered via the epidural route. *Eur J Anaesthesiol*. 2008 May;25:403-9.
15. Asano T, Dohi S, Ohta S, Shimonaka H, Iida H. antinociception by epidural and systemic alpha 2-adrenoceptor agonists and their binding affinity in rat spinal cord and brain. *Anesth Analg*. 2000 Feb;90(2):400-7.
16. Maroof M, Khan SA, Jain D, Khan RM, Maroof SM. Evaluation of effect of dexmedetomidine in reducing shivering following epidural anesthesia. *Anesthesiology*. 2004;101:A495.
17. Gupta R, Bogra J, Verma R, Kohli M, Kushwaha K, Kimar S. Dexmedetomidine as an intrathecal adjuvant for postoperative analgesia. *Indian J Anaesth*. 2011;55(4):347-51.
18. Gupta R, Bogra J, Verma R, Kohli M, Raman R, Kushwaha JK. A comparative study of intrathecal dexmedetomidine and fentanyl as adjuvants to bupivacaine. *J Anesthesiol Clin Pharmacol*. 2011;27:339-43.
19. Kanazi GE, Aouad MT, Jabbour-Khoury SI, Al-Jazzar MD, Alameddine MM, Al-Yaman R, et al. Effect of low-dose dexmedetomidine or clonidine on the characteristics of bupivacaine spinal block. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2006 Feb;50(2): 222-7.
20. Eisenach JC, De Kock M, Klincha V. Alpha(2) adrenergic agonists for regional anesthesia. *Anesthesiology*. 1996 Sep;85(3):665-74.
21. Salgado PF, Sabbag AT, Silva PC, Brienze SL, Dalto HP, Modolo NS et al. Synergistic effects between dexmedetomidine and 0,75% ropivacaine in epidural anesthesia. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(2):100-5.
22. Eisenach J, Shafer S, Bucklin B, Carswell J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intraspinal dexmedetomidine in sheep. *Anesthesiology*. 1994 Jun;80(6):1349-59.
23. Myers RR, Sommer C. Methodology for spinal neurotoxicity studies. *Reg Anesth*. 1993;18(6 Suppl):439-47.
24. Sabbe MB, Grafe MR, Pfeifer BL, Mirzai TH, Yaksh TL. Toxicology of baclofen continuously infused into the spinal intrathecal space o the dogs. *Neurotoxicology*. 1993;14:397-410.
25. Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, Austin E, Sumi SM. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology*, 1985 Oct;63(4):364-70.
26. Wakamatsu H, Matsumoto M, Nakakimura K, Sakabe T. The effects of moderate hypothermia and intrathecal tetracaine on glutamate concentrations of intrathecal dialysate and neurologic and histopathologic outcome in transient spinal cord ischemia in rabbits. *Anesth Analg*. 1999 Jan;88(1):56-62.

27. Hashimoto K, Karasawa F, Sayoh T. Intrathecal midazolam attenuates renal sympathetic nerve activity in rabbits. *Masui*. 1997 Aug;46(8):1059-65.
28. Demerel E, Ugur HC, Dolgun H, Kahilogulari G, Sargon ME, Egemen N et al. neurotoxic effects of intrathecal midazolam and neostigmine in rabbits. *Anaesth Intensive Care*. 2006 Apr;34(2):218-23.
29. Borgbjerg FM, Svensson BA, Frigast C, Gordh T Jr. Histopathology afert repeated intrathecal injections of preservative-free ketamine in rabbits: a light and electron. *Anesth Analg*. 1994 Jul;79(1):105-11.
30. Vranken JH, Troost D, Haan P, Pennings FA, Vegt MH, Dijkgraaf MGW et al. Severe toxic damage to the rabbit spinal cord after intrathecal administratin of reservative-free S (+)-ketamine. *Anesthesiology*. 2006 Oct;105(4):813-8.
31. Saeki H, Matsumoto M, Kaneko S, Tsuruta S, Cui YJ, Ohtake K et al. Is intrathecal magnesium sulfate safe and protective against ischemic spinal cord injury in rabbits? *Anesth Analg*. 2004 Dec;99(6):1805-12.
32. DeLeo JA, Colburn RW, Rickman AJ, Yeager MP. Intrathecal catheterization alone induces neuroimmune activation in the rat. *Eur J Anaesthesiol*. 1997;1:115-22.
33. Long JB, Mobley WC, Holaday JW. Neurological dysfunction after intrathecal injection of Dynorphin A (1-13) in rat. 1. Injection producers modify pharmacological responses. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;246:1158-66.
34. Dirksen R, Lerou J, Nijhuis GMM, Booij LHDJ, Jurna I. Intrathecal somatostatin produces effects dependent on the interval between catheter implantation and drug injection. *Life Sci*. 1990;47:1347-54.
35. Madsen JB, Molke JF, Faber T, Bille-Hansen V. Chronic catheterization of epidural space in rabbits;a model for behavioural and histopathological studies. Examination of meptazinol neurotoxicity. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1993;37:307-13.
36. Grip G, Svensson BA, Gordth Jr T, Post C, Hartvig P. Histopathology and evaluation of potentiation of morphine-induced antinociception by intrathecal droperidol in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1992 Feb;36(2):145-52;36:145-52.
37. Brock-Utne JG, Mankowitz E, Kallichurum S, Downing JW. Effects of intrathecal saline and ketamine with and without preservative on the spinal roots of monkeys. *S Afr Med J*. 1982 Mar;61(10):360-1.
38. Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurological outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology*. 1989 Jan;70(1):64-70.
39. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001 Aug;23(4):291-9.

40. Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image Processing with Image J. *Biophotonics Int.* 2004; 11:36-42.
41. Colour Deconvolution. Landini G, 2010. (Accessed 11/11, 2011, at <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>).
42. Okagawa SR, Ganem EM, Marques ME, Castiglia YMM. Efeitos de concentrações crescentes de lidocaína hiperbárica, administradas no espaço subaracnóideo, sobre a medula espinhal e as meninges. Estudo experimental no cão. *Rev Bras Anesthesiol.* 2006 Jun;56(3):253-62.
43. Adams HJ, Mastri AR, Eicholzer AW, Kilpatrick G. Morphologic effects of intrathecal etidocaine and tetracaine on the rabbit spinal cord. *Anesth Analg.* 1974 Nov-Dec;53(6):904-8.
44. Santos ALQ, Lima EMM, Santana MIS. Length of spinal cord and topography of medular cone in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Bioscience J (UFU).* 1999;15:45-62.
45. Ting PH, Antonakakis JG. Evidence-based review of ultrasound imaging for regional anesthesia. *Semin Anesth.* 2007;26:218-28.
46. Rosen MA, Baysinger CL, Shnider SM, Dailey PA, Norton M, Curtis JD, Collins M, Davis RL et al. Evaluation of neurotoxicity after subarachnoid injection of large volumes of local anesthetic solutions. *Anesth Analg.* 1983 Sep;62(9):802-8.
47. Selander D, Brattsand R, Lundorf G, Nordborg C, Olsson Y. Local anaesthesia, importance of mode of application, concentration and adrenaline for the appearance of nerve lesions. An experimental study of axonal degeneration and barrier damage after intrafascicular injection or topical application on bupivacaine (marcain). *Acta Anaesth Scand.* 1979 Apr;23(2):127-36.
48. Rice AS, McMahon SB. Peripheral nerve injury caused by injection needles used in regional anaesthesia: influence of bevel configuration, studied in a rat model. *Br J Anaesth.* 1992 Nov;69(5):433-8.
49. Moore S, Thanos S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol.* 1996 Mar-Apr;48(4-5):441-60.
50. O'Callaghan JP, Miller D. Nervous system-specific proteins as biochemical indicators of neurotoxicity. *Trends Neurosci.* 1983;4:388-90.
51. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia.* 1993 Jan;7(1):111-8.
52. Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci.* 1996 Aug;19(8):331-8.

53. Ganem EM, Vianna PT, Marques M, Castiglia YM, Vane LA. Neurotoxicity of subarachnoid hyperbaric bupivacaine in dogs. *Reg Anesth*. 1996 May-Jun;21(3):234-8.
54. Ganem EM, Vianna PT, Marques M, Castiglia YM, Vane LA. Efeitos da administração de grandes volumes de lidocaína a 2% e ropivacaína a 1% sobre a medula espinhal e as meninges. Estudo experimental em cães. *Rev Bras Anesthesiol*. 2003 Jun;53(3):351-60.
55. Barros GAM, Marques MEA, Ganem EM. The effects of intrathecal administration of betamethasone over dogs spinal cord and meninges. *Acta Cir Bras*. 2007 Sep-Oct;22(5):361-5.
56. Fukushima FB; Barros GAM, Marques MEA, Vidal EIO, Ganem EMG. The neuraxial effects of intraspinal amitriptyline at low concentrations. *Anesth Analg*. 2009 Sep;109(3):965-71.
57. Lima RM, Navarro LH, Carness JM, Barros GA, Marques MEA, Solanki D, Ganem EM. Clinical and histological effects of the intrathecal administration of methylprednisolone in dogs. *Pain Physician*. 2010 Sep;13(5):493-501.
58. Kaupila T, Kemppainen P, Tanila H, Pertovaara A. Effect of systemic medetomidine, an alfa2 adrenoceptor agonist, on experimental pain in humans. *Anesthesiology*. 1991 Jan;74(1):3-8.
59. Fairbanks CA, Kitto KF, Nguyen HO, Stone LS, Wilcox GL. Clonidine and dexmedetomidina produce antinociceptive synergy in mouse spinal cord. *Anesthesiology*. 2009 Mar;110(3):638-47.
60. Kumazawa T, Perl ER. Excitation of marginal and substantia gelatinosa neurons in the primate spinal cord: indications of their place in dorsal horn functional organization. *J Comp Neurol*. 1978 Feb;177(3):417-34.
61. Okamoto T, Ishifuji S, Taoda M, Kai T, Morita I. Dexmedetomidine for sedation during voice monitoring surgery in a patient with an episode of seizure. *Masui*. 2008 Aug;57(8):1013-16.
62. Dawson C, Ma D, Chow A, Maze M. Dexmedetomidine enhances analgesic action of nitrous oxide: mechanisms of action. *Anesthesiology*. 2004 Apr;100(4):894-904.
63. Tamagaki S, Suzuki MH, Hagihira S, Hayashi Y, Mashimo T. Systemic daily morphine enhances the analgesic effects of intrathecal dexmedetomidina via α -regulation of alpha 2 adrenergic receptor subtypes A, B and C in dorsal root ganglion and dorsal horn. *J Pharm Pharmacol*. 2010 Dec;62(12):1760-7.
64. Ishii H, Kohno T, Yamamura T, Ikoma M, Baba H. Action of dexmedetomidine on the substantia gelatinosa neurons of rat spinal cord. *Eur J Neurosci*. 2008 Jun;27(12):3182-90.

65. Laudenbach V, Mantz J, Lagercrantz H, Desmots JM, Evrard P, Gressens P. Effects of α_2 -adrenoceptor agonists on perinatal excitotoxic brain injury: comparison of clonidine and dexmedetomidina. *Anesthesiology*. 2002 Jan;96(1):134-41.
66. Ma D, Hossain M, Rajakumaraswamy N, Arshad M, Sanders RD, Franks NP, Maze M. Dexmedetomidine produces its neuroprotective effects via α_2 - adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct;502(1):87-97.
67. Fisher B, Zornow MH, Yaksh PL, Peterson Bm. Antinociceptive properties of intrathecal dexmedetomidine in rat. *Eur J Pharmacol*. 1991 Jan;192(2):221-5.
68. Hou J, Xia Z, Xiao X, Wan X, Zhao B. Neurotoxicity of intrathecal injections of dexmedetomidine into the rat spinal dorsal horn. *Neural Regen Res*. 2012 Aug;7(23):1765-70.
69. Yan M, Zhang Lc, dai TJ et al. Propofol depresses c-fos expression of NOS neurons in spinal cord of rats with inflammatory pain. *Sheng Li Xue Bao*. 2002 Feb;54(1):60-4.