



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

**Roberto Bezerra Vital**

O baclofeno determina alterações histológicas sobre  
a medula espinal e 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. Dra. Eliana Marisa Ganem

Coorientador: Dr. Flavio Ramalho Romero

Botucatu

2018

Roberto Bezerra Vital

O baclofeno determina alterações histológicas sobre a medula espinal e 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. Dra. Eliana Marisa Ganem

Coorientador: Dr. Flavio Ramalho Romero

Botucatu

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Vital, Roberto Bezerra.

O Baclofeno determina alterações histológicas sobre a medula espinal e meninges de coelhos? / Roberto Bezerra Vital. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Eliana Marisa Ganem  
Coorientador: Flávio Ramalho Romero  
Capes: 40102130

1. Baclofeno. 2. Espasticidade Muscular. 3. Síndromes neurotóxicas. 4. Coelhos. 5. Meninges.

Palavras-chave: baclofeno; coelho; espasticidade muscular; meninges; síndromes neurotóxicas.

## DEDICATÓRIA

*À minha esposa Rita Medeiros Ferreira, por sempre estar ao meu lado me cobrando e apoiando em toda jornada.*

*Aos meus pais Roberto e Solange bem como meu irmão Renan, os quais sempre com carinho e dedicação me ajudaram a superar obstáculos e possibilitaram a realização dos meus sonhos.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

*À minha querida professora titular Eliana Marisa Ganem que desde o início me guiou e orientou, sempre me estimulando, corrigindo e ensinando. Sem seu conhecimento e paciência há muito teria desistindo, mas sua insistência e confiança em meu caráter nos trouxe ao fim de mais uma jornada.*

## AGRADECIMENTOS

*Esta pesquisa foi concretizada com o apoio de várias pessoas ao longo dos últimos anos e algumas ao longo da minha vida.*

*A todos meus professores dentro e fora da residência em Botucatu;*

*Incluo aqui alguns da Neurocirurgia: Marco Antônio Zanini, Roberto Colichio Gabarra, Antônio Tadeu Faleiros, Flávio Ramalho Romero, Luis Gustavo Ducati, Carlos Clayton Macedo de Freitas, Ivan Tadeu Ferreira Antunes;*

*Vários da Neurologia como Rodrigo Bazan, Arthur Oscar Schelp, Ronaldo Guimarães Fonseca, Luiz Eduardo Gomes Garcia Betting;*

*Incontávei da Anestesiologia como Eliana Marisa Ganem, Norma Sueli Pinheiro Módolo, Lais Helena Navarro e Lima, Leandro Gobbo Braz, Yara Marcondes Machado Castiglia;*

*Não poderia esquecer de vários mestres, colegas e amigos de residência: Renan Luiz Lapate, Kleber Carlos Azevedo Júnior, Pedro Tadao Hamamoto Filho, Vitor César Machado, Victor Azevedo de Oliveira;*

*Agradeço ainda à dona Joana Jacirene Costa Teixeira, secretária do Departamento de Anestesiologia da UNESP;*

*À Neli Aparecida Pavan e demais funcionários do Departamento de Anestesiologia da UNESP por todo auxílio dado;*

*À Profa. Dra. Vânia Maria Vasconcelos Machado, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pelo auxílio em nossa pesquisa;*

*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, e a CAPES pela bolsa de auxílio.*

*Não poderia deixar de agradecer por último, porém não menos importante Tatiane de F. Pineiz Biondo, secretária da pós-graduação em Anestesiologia da UNESP, a qual sem sua ajuda nada disto teria acontecido.*

"Derrotar o inimigo em cem batalhas não é a excelência suprema; a excelência suprema consiste em vencer o inimigo sem ser preciso lutar."

*Sun Tzu*



Vital RP. O baclofeno determina alterações histológicas sobre a medula espinal e meninges de coelhos? [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2018.

## **RESUMO**

A espasticidade leva a perda na qualidade de vida, capacidade funcional do indivíduo e a alterações psicossociais. O baclofeno é fármaco relaxante muscular de ação central, utilizado no tratamento da espasticidade e é substância análoga ao ácido gama amino-butírico (GABA). Sua administração por via subaracnoidea permite que doses pequenas sejam utilizadas, minimizando efeitos adversos. A pesquisa consistiu em determinar os efeitos da administração de baclofeno em dose única, no espaço subaracnoideo de coelhos, sobre a medula espinal e as meninges. Foram utilizados coelhos, divididos em três grupos: G1, G2 e G3, com injeção no espaço subaracnoideo de soro fisiológico, baclofeno 100 µg e 200 µg respectivamente. Posteriormente foram realizadas as análises histológicas das meninges e medula dos coelhos. Os resultados da presente pesquisa mostram que o baclofeno, independente da dose administrada, causou lesão de tecido nervoso e de meninges em 20% (n=8) dos coelhos estudados. As alterações histológicas foram predominantemente observadas na região posterior das meninges. Podemos concluir que neste modelo experimental em coelhos o baclofeno desencadeou reação inflamatória no tecido nervoso e nas meninges.

Palavras-chave: baclofeno; espasticidade muscular; síndromes neurotóxicas.

## **ABSTRACT**

Spasticity leads to a reduced quality of life, functional capacity limitations, and changes in the psychosocial well-being of an individual. Baclofen is a centrally acting muscle relaxant that is used in the treatment of spasticity and is an analog of gamma-amino-butyric acid. Its administration via the subarachnoid route allows the use of small doses, thus minimizing adverse effects. The aim of the study was to determine the effects of administration of a single dose of baclofen into the subarachnoid space of rabbits, on the spinal cord and meninges. Methods: The rabbits were divided into three groups. The first group (G1) was injected with saline solution. The second and third groups (G2 and G3) received 100 and 200 µg of baclofen in the subarachnoid space, respectively. Histological analysis of the meninges and spinal cord in rabbits was subsequently performed. The present findings showed that baclofen, regardless of the administered dose, caused damage to the nerve tissue and meninges in 20% (n = 8) of the tested rabbits. The histological changes were predominantly observed in the posterior portion of the meninges. We conclude that, in this rabbit experimental model, baclofen caused an inflammatory reaction in the nervous tissue and meninges.

**Keywords:** baclofen; muscle spasticity; neurotoxicity Syndromes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de animal do G1. H&E 10x.....	33
<b>Figura 2</b>	Tecido nervoso (A) e meninges (C) normais de animal do G1. H&E 40x.....	34
<b>Figura 3</b>	Infiltrado inflamatório perivascular linfocitário intraparenquimatoso (B) e no espaço de Virchow Robin (C), infiltrado inflamatório histiocitário intraparenquimatoso (A) e o redor do canal medular (D) de animal do G2(b). H&E 40x.....	34
<b>Figura 4</b>	Infiltrado inflamatório perivascular linfocitário intraparenquimatoso (B) e no espaço de Virchow Robin (C) e o redor do canal medular (D) de animal do G1(b). H&E 100x.....	35
<b>Figura 5</b>	Infiltrado inflamatório perivascular linfocitário intraparenquimatoso (B), infiltrado inflamatório histiocitário intraparenquimatoso (A) e o redor do canal medular (D) de animal do G1(b). H&E 100x.....	35
<b>Figura 6</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter de animal do G2 (e). HE 100x.....	36
<b>Figura 7</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter de animal do G2 (e). HE 400x.....	36
<b>Figura 8</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter de animal do G2 (e). HE 400x.....	37
<b>Figura 9</b>	Infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter e aracnoide de animal do G3 (h). HE 40x.....	37
<b>Figura 10</b>	Infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter e aracnoide de animal do G3 (h). HE 100x.....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Peso (g) e comprimento (cm) de coluna dos animais pertencentes aos três grupos de estudo.....	30
<b>Tabela 2</b>	Peso (g) e comprimento de medula espinal (cm) dos animais pertencentes aos três grupos de estudo. Resultados expressos em média e desvio padrão.....	30
<b>Tabela 3</b>	Resultados histológicos do tecido nervoso e das meninges dos animais de ambos os grupos que apresentaram alterações à microscopia óptica. Animais do G2 (letras a-e) e do G3 (letra f-h)	32

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 HIPÓTESE .....	18
3 OBJETIVO .....	19
4 MÉTODOS .....	20
4.1 Animais utilizados .....	20
4.2 Grupos experimentais .....	20
4.3 Sequência experimental .....	21
4.4 Técnicas utilizadas .....	22
4.4.1 Preparo do animal .....	22
4.5 Punção subaracnoidea .....	23
4.5.1 Técnica de punção .....	23
4.5.2 Volume injetado .....	23
4.5.3 Solução administrada .....	24
4.6 Observação clínica .....	24
4.7 Sacrifício .....	25
4.8 Exame histológico .....	25
4.10 Modelo de estudo .....	28
4.11 Método estatístico .....	29
5 RESULTADOS .....	30

6 DISCUSSÃO .....	39
6.1. Modelo Experimental .....	39
6.2 Discussão dos Resultados .....	40
6.3 Limitações do estudo .....	42
7 CONCLUSÃO .....	44
8 REFERÊNCIAS .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

A espasticidade é fenômeno de aumento patológico do tônus neuromuscular que consiste na contração sustentada de grupos musculares decorrentes da desinibição do motoneurônio inferior<sup>1,2</sup>. Este fenômeno ocorre quando há lesão permanente e prolongada do motoneurônio superior, seja de origem medular (traumatismos raquimedulares, esclerose múltipla, mielite transversa) ou encefálica (paralisia cerebral, traumatismos cranioencefálicos, doenças cerebrovasculares)<sup>3,4</sup>.

A espasticidade como sequela neuromuscular leva à perda na qualidade de vida, à perda da capacidade funcional do indivíduo e a alterações psicossociais, como ansiedade e depressão, tanto para o paciente como para seus cuidadores<sup>2,5-8</sup>.

O tônus depende de propriedades de elasticidade e viscosidade do músculo e de sua placa neural, consiste na resistência fisiológica a movimentos passivos. A elasticidade é a capacidade de as fibras musculares voltarem ao seu estado original após estiramento, enquanto a viscosidade é a resistência do tecido muscular à deformação<sup>1</sup>.

A espasticidade faz parte de uma gama de sintomas que variam desde o aumento isolado do tônus muscular, encurtamento de tendões até rigidez articular<sup>9,10</sup>. Após a cronificação do quadro, os tecidos conjuntivo e adiposo substituem sarcômeros normais, causando um ciclo vicioso que culmina em dores locais ou difusas, quedas, contraturas, e quando mais graves, levam à síndrome de imobilidade com úlceras de pressão e infecções<sup>1</sup>.

O baclofeno (4-amino-3-[4-chlorophenyl]-ácido-butírico)<sup>11,12</sup> é fármaco relaxante muscular de ação central, utilizado principalmente no tratamento da espasticidade de origem medular ou encefálica. Como substância é  $\beta$ -4-chlorophenyl-

ácido gama aminobutírico)<sup>12-14</sup>, um análogo ao ácido gama amino-butírico (GABA) e atua como agonista dos receptores GABA-B na medula espinal, mais especificamente no gânglio da raiz dorsal e substância cinzenta da coluna dorsal (lâminas I e II de Rexed)<sup>15,16</sup>. O baclofeno é metabolizado majoritariamente pelos rins<sup>11</sup>, cerca de 69-85% e uma pequena parte (aproximadamente 15%) pelo fígado<sup>13,17,18</sup>.

Em sítios pré-sinápticos, o baclofeno reduz a liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato). A ativação de receptores GABA-B pós-sinápticos leva à hiperpolarização dos neurônios do corno posterior da medula, reduzindo, então, a excitabilidade dos motoneurônios<sup>15</sup>. O efeito antiespástico deve-se, portanto, à inibição dos reflexos mono e polissinápticos, diminuindo a ação da musculatura antagonista<sup>19</sup>.

A eficácia do baclofeno quando administrado por via oral é baixa, uma vez que sua passagem pela barreira hematoencefálica é limitada, atingindo concentrações 8.4 vezes menores no líquido que no plasma<sup>17</sup>, sendo necessárias altas doses para obtenção de efeito terapêutico. Estas geralmente são acompanhadas por efeitos adversos, tais como sedação e sonolência<sup>11,15,20-22</sup>, entre outros efeitos neurológicos<sup>21-23</sup>, podendo em casos mais graves levar à hipotonia muscular<sup>21,22</sup>, depressão respiratória<sup>21,22,24</sup> e até cardiomiopatia nos casos mais graves<sup>21,24,25</sup>.

A administração de baclofeno por via subaracnoidea permite que doses menores sejam utilizadas, minimizando estes efeitos indesejados<sup>2,15,20</sup>. Este método foi proposto em 1984<sup>26</sup> e, desde então, vem sendo amplamente utilizado<sup>27-31</sup>, com eficácia clínica bem documentada<sup>31-36</sup>. O uso do baclofeno via subaracnoidea é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento de espasticidade em casos refratários ou de intolerância à medicação por via oral. A sua utilização pode ser feita tanto em *bolus* como em infusão contínua<sup>15,37</sup>.



A toxicidade do baclofeno, embora evento raro, é relatada quando o fármaco é administrado pelas vias subaracnoidea<sup>24,38-41</sup> e oral<sup>42-44</sup> e está, na maioria das vezes, relacionada com sobredose, abstinência e/ou pacientes com alteração na função renal<sup>11,13,14,21-23,25</sup>.

Em relação à neurotoxicidade espinal do baclofeno, é de nosso conhecimento a existência de somente um estudo publicado na literatura até o momento, o qual foi realizado em cães recebendo infusão subaracnoidea contínua de baclofeno por meio de cateter conectado a bomba de infusão<sup>45</sup>. Não foram demonstradas alterações na histologia espinal ou meníngea relacionadas ao fármaco. Os autores concluíram que não há neurotoxicidade desencadeada pela administração subaracnoidea crônica de baclofeno em concentrações até 2000 µg/ml.

Diversas espécies de animais podem ser utilizados para o estudo de neurotoxicidade dentre elas coelhos, desde o início do século passado<sup>46</sup>. Diversos autores pesquisaram, nesta espécie, os efeitos de anestésicos locais<sup>19,47-53</sup> dos benzodiazepínicos<sup>54,55</sup>, de anticolinesterásicos<sup>55</sup>, de antagonistas do receptor *N*-metil-D-aspartato<sup>56,57</sup>, dentre outras soluções<sup>58</sup>.

Na grande maioria destas pesquisas a solução foi introduzida no espaço subaracnoideo por meio de cateter implantado de forma crônica<sup>19,48-50,52,54-58</sup> e, em alguns estudos, foram observadas, nos animais do grupo controle, células inflamatórias nas meninges<sup>48,56</sup> e no tecido nervoso<sup>56</sup> ao redor do cateter. Também foram constatadas alterações neuroimunes que se manifestaram pelo aumento de marcadores gliais (OX-42 e GFAP) e pela expressão de citocinas específicas (IL6 e IL10)<sup>59</sup>.

A presença de cateter no espaço subaracnoideo e o tempo de implantação do mesmo podem comprometer a administração do fármaco e as respostas desencadeadas pelo agente estudado<sup>60,61</sup>. Somando-se a isto, a cateterização crônica do espaço subaracnoideo e peridural pode produzir alterações histológicas no tecido nervoso medular, em torno do cateter<sup>62,63</sup>. Alguns autores<sup>56</sup> 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 pode induzir edema das raízes nervosas, como observado em macacos<sup>64</sup>.

Em dois estudos realizados em coelhos<sup>47,51</sup>, nos quais os fármacos foram administrados no espaço subaracnoideo por meio de 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 espinal no local da punção<sup>51</sup>, que foi realizada entre a última vértebra lombar e a primeira vértebra sacral.

A abordagem do espaço subaracnoideo em coelhos foi inicialmente descrita por Bieter *et al.*, em 1936<sup>46</sup> que abordaram o espaço lombo-sacral para introdução de soluções. Posteriormente Ready *et al.*<sup>47</sup> ressaltaram que, no coelho, o espaço subaracnoideo poderia ser abordado entre a primeira e a segunda vértebra sacral, pela via paramediana, e que o volume do líquido era pequeno e não refluía através do canhão da agulha. Para diminuir a manipulação da agulha, e conseqüentemente, a possibilidade de trauma do tecido nervoso desencadeado pela punção, o espaço subaracnoideo foi identificado com auxílio de estimulador de nervo periférico<sup>47</sup>.

Quando se propõe a estudar neurotoxicidade, a seleção da espécie animal deve ser realizada com critério, especialmente se os resultados obtidos serão extrapolados para os

seres humanos<sup>65</sup>. O espaço subaracnoideo de ratos é de tamanho limitado, o que provoca menores diluições e misturas do fármaco no líquido, favorecendo o maior contato da substância estudada com o tecido nervoso, podendo induzir resultados superestimados. Por outro lado, o cão é uma boa espécie para o estudo de neurotoxicidade, uma vez que seu espaço subaracnoideo é comparável ao dos seres humanos<sup>45</sup>, entretanto sua utilização em trabalhos de pesquisa experimental foi proibida no estado de São Paulo.

## **2 HIPÓTESE**

O baclofeno não causa lesão no tecido nervoso medular ou nas meninges quando administrado por via subaracnoidea.

### **3 OBJETIVO**

Determinar os efeitos da administração de baclofeno após punção única, no espaço subaracnoideo de coelhos, sobre a medula espinal e as meninges.

## **4 MÉTODOS**

### **4.1 Animais utilizados**

Após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo CEUA 1135-2105), foram utilizados 42 coelhos adultos jovens, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 3000 gramas e 4500 gramas e comprimento de coluna entre 38 e 40 centímetros, fornecidos pelo Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

A parte experimental da pesquisa foi realizada na Unidade de Pesquisa Experimental – Unipex dentro da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” em Botucatu. A análise histológica foi realizada no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas de Botucatu.

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

Os animais foram randomizados em três grupos experimentais.

### **4.2 Grupos experimentais**

Os animais foram distribuídos por lista gerada por computador e envelopes selados em três grupos experimentais, com 14 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 e dose das soluções administradas, ou seja:

Grupo 1 (G1) – solução salina a 0,9%

Grupo 2 (G2) – baclofeno (100 µg)

Grupo 3 (G3) – baclofeno (200 µg)

As doses foram escolhidas baseando-se na dose máxima de 20 µg/kg em seres humanos e calculando-se a dose equivalente animal (DEA), que corresponde em coelhos 63 µg/kg<sup>66-68</sup>.

### 4.3 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 intravenosa 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 30 dias sob observação clínica.

- Sacrifício do animal.
- Remoção da medula espinal em sua porção lombar e sacral.
- Fixação da peça anatômica.
- Análise da histologia

## **4.4 Técnicas utilizadas**

### ***4.4.1 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<sup>-1</sup> de peso corporal, e cloridrato de cetamina, na dose de 10 mg.kg<sup>-1</sup> 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 lombossacral<sup>47</sup>.

Foi realizada a limpeza da pele e pêlos da região da coluna vertebral com água e sabão seguida de tricotomia em área de 5 cm ao redor do local onde foi realizada a punção, correspondente ao espaço intervertebral S1 – S2. Esta região foi lavada com solução salina a 0,9% e, após a antissepsia com solução tópica de gluconato de clorexidina a 2%, foram colocados os campos estéreis.



## **4.5 Punção subaracnoidea**

### ***4.5.1 Técnica de punção***

No coelho, o espaço mais caudal que permite a abordagem do espaço subaracnoideo encontra-se entre as vértebras S1 e S2. Para a identificação deste espaço e a determinação do local da punção subaracnoidea, 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 vertebra sacral<sup>47</sup>.

A punção do espaço 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 10 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 até o ligamento amarelo, então guiada por ultrassom, até penetrar o espaço subaracnoideo.

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

### ***4.5.2 Volume injetado***

Foram administrados 5 µL por centímetro de medula espinal (0,2 mL)<sup>47</sup>, injetados em 1 segundo, em seringa de 1 mL, descartável. Foram utilizadas concentrações de 500µg e 1000µg de baclofeno respectivamente, em G2 e G3.

### **4.5.3 Solução administrada**

A solução salina 0,9% (Grupo 1) foi sintetizada pela indústria farmacêutica Hipolabor® e o baclofeno sem conservante nas dosagens 100 e 200 µg (Grupos 2 e 3 respectivamente) sintetizado pela indústria farmacêutica Citopharma® foram as soluções utilizadas. As soluções de baclofeno não possuíam conservantes e utilizaram cloreto de sódio para correção de osmolaridade e veículo.

## **4.6 Observação clínica**

Os animais permaneceram em cativeiro durante 30 dias, sob observação clínica. Após a injeção da solução sorteada, os animais foram retirados da mesa cirúrgica e, quando recuperados da anestesia venosa, foram avaliados clinicamente quanto à motricidade e à sensibilidade dolorosa.

A motricidade foi avaliada pela observação clínica, baseado no critério estabelecido por Drummond e Moore<sup>69</sup>, 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. 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.

## 4.7 Sacrifício

O sacrifício foi realizado por decapitação, após anestesia prévia com xilazina e cetamina pela via venosa. A porção lombar e sacral da medula espinal e as raízes 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 fixados em solução de formalina tamponada a 10% para posterior exame histológico.

## 4.8 Exame histológico

As peças anatômicas permaneceram, durante sete dias, em solução de formalina tamponada. 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 um (1) centímetro. Os cortes dos tecidos foram colocados em blocos de parafina e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE)<sup>51,70-72</sup>.

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-máter máter (D) + aracnoide (A)
- 2-A+pia máter (P)

- 3-D+A+P

**Espessamento de meninge:**

- 0- Ausente
- 1- Leve
- 2- Moderado
- 3- Intenso

**Infiltrado inflamatório:**

- 1- 1/2+
- 2- +
- 3- ++
- 4- +++
- 5- ++++

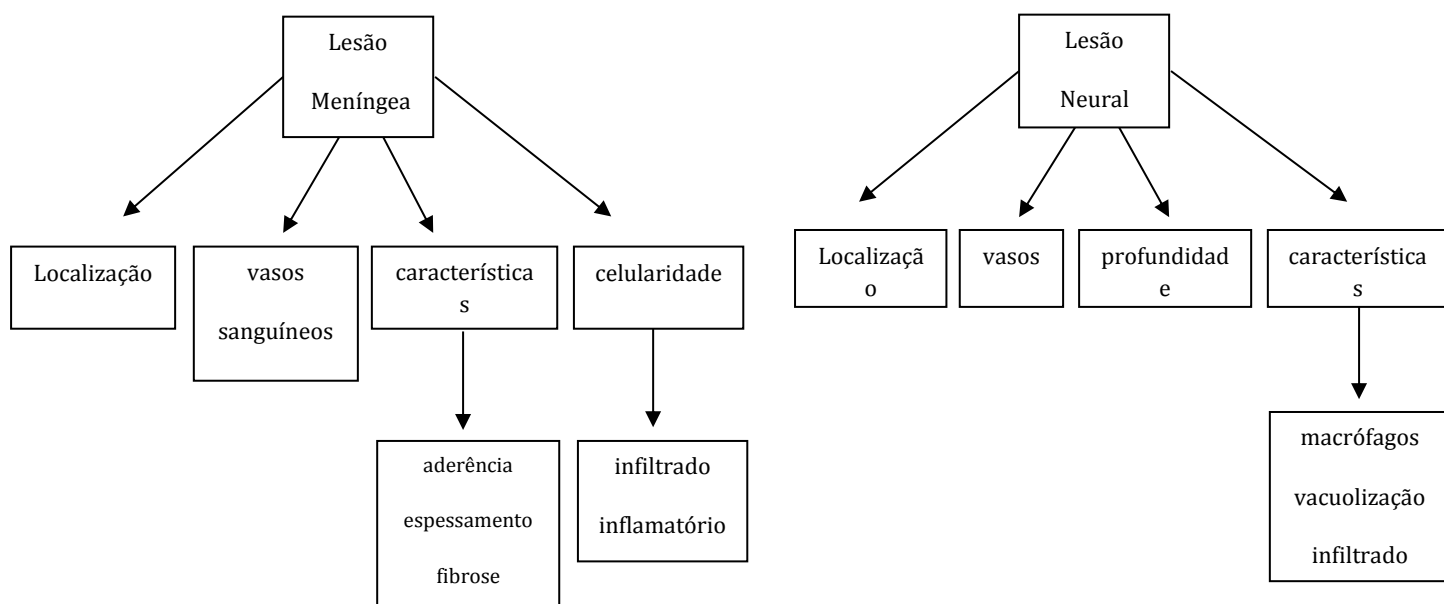
**Fibrose:**

- 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 (MEAM, RBV, EMG)



Organograma da avaliação histológica

#### 4.10 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 e opacos. A preparação das soluções administradas nos animais dos três grupos foi realizada por pesquisador não envolvido diretamente na realização da técnica.

#### **4.11 Método estatístico**

Admitindo-se porcentagem de lesão no grupo controle de 0%, poder de teste igual a 0,80 e erro tipo I igual a 0,05, estimou-se necessários 14 coelhos por grupo para detectar diferença estatisticamente significativa igual ou superior a 5%.

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 ANOVA (resultados expressos em média e desvio padrão).

## 5 RESULTADOS

O peso e o comprimento de medula espinal dos animais dos três grupos estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1** - Peso (g) e comprimento (cm) de coluna dos animais pertencentes aos três grupos de estudo

	G1		G2		G3	
	Peso	CM	Peso	CM	Peso	CM
1	4100	40	3500	40	3600	40 *f
2	3400	40	3900	40	3800	40
3	3150	38	3400	40	4000	40
4	3900	40	3400	40	3500	40
5	4000	40	3900	40	3700	40
6	3500	40	3000	40*a	3200	40*g
7	3200	40	3700	40	3400	40*h
8	4100	40	3900	40*b	3400	40
9	3900	38	3200	40	3300	40
10	3600	40	3700	40*c	3450	40
11	3200	40	3600	40*d	3000	40
12	3800	38	3750	40	3700	40
13	3200	40	3800	40*e		
14	3500	40				

CM – Comprimento de medula, \*letra minúscula – animais com lesão de tecido nervoso e meninges

**Tabela 2** – Peso (g) e comprimento de medula espinal (cm) dos animais pertencentes aos três grupos de estudo. Resultados expressos em média e desvio padrão

	G1	G2	G3	Estatística
Peso (g)	3610±125	3600±80	3500±75	p = 0,65
CM (cm)	39,6±0,7	40±0	40±0	p = 0,06

CM – Comprimento de medula

Três animais foram excluídos (1 coelho de G2 e 2 coelhos de G3) da pesquisa porque a dispersão da substância injetada no espaço subaracnóideo não foi visibilizada pelo ultrassom. Destes um pertencia ao G2 e dois, ao G3. O líquido não refluíu pela agulha de punção após acessar o espaço subaracnoideo em nenhum animal.



Apenas um coelho de G3 (f) apresentou paralisia nos membros posteriores e cauda elevada após a recuperação da anestesia venosa. No primeiro dia de cativeiro estas alterações desapareceram e o animal permaneceu normal sob ao ponto de vista neurológico durante os 30 dias de cativeiro. Os demais permaneceram sem alterações de motricidade e sensibilidade após a introdução no espaço subaracnoideo das soluções sorteadas assim como durante todo o período que permaneceram em cativeiro sob observação clínica.

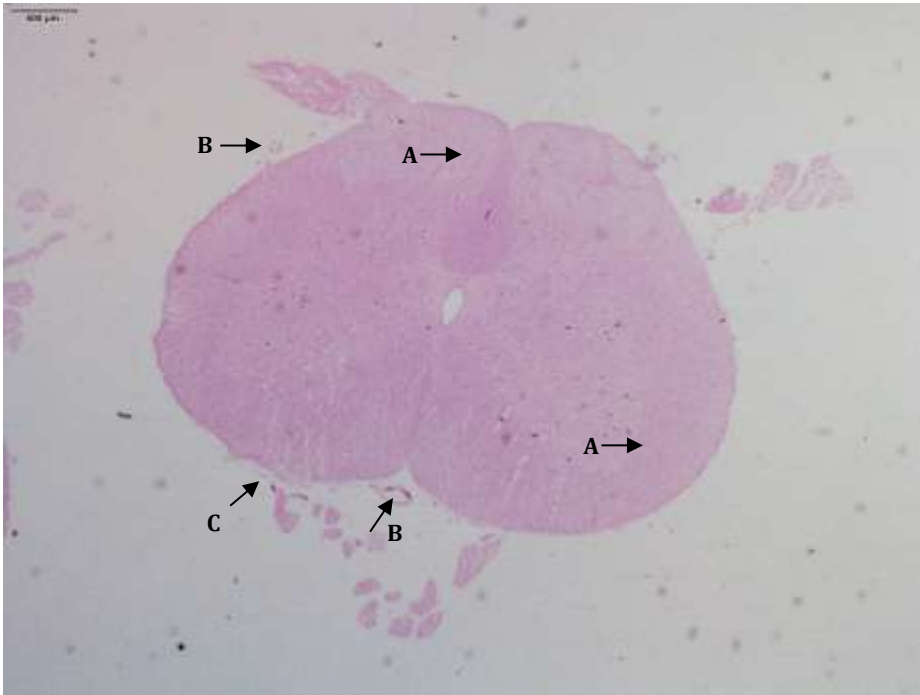
Após a análise dos tecidos à microscopia óptica, nenhum animal de G1(solução fisiológica 0,9%) apresentou alteração histológica do tecido nervoso ou das meninges. Oito animais apresentaram alterações histológicas do tecido nervoso e/ou das meninges. Destes cinco pertenciam ao G2 (100 $\mu$ g de baclofeno), sendo um deles aquele que apresentou alteração histológica do tecido nervoso à microscopia óptica e três ao G3 (200 $\mu$  de baclofeno) (tabela 2 e tabela 3)

**Tabela 3** – Resultados histológicos do tecido nervoso e das meninges dos animais de ambos os grupos que apresentaram alterações à microscopia óptica. Animais do G2 (letras a-e) e do G3 (letra f-h)

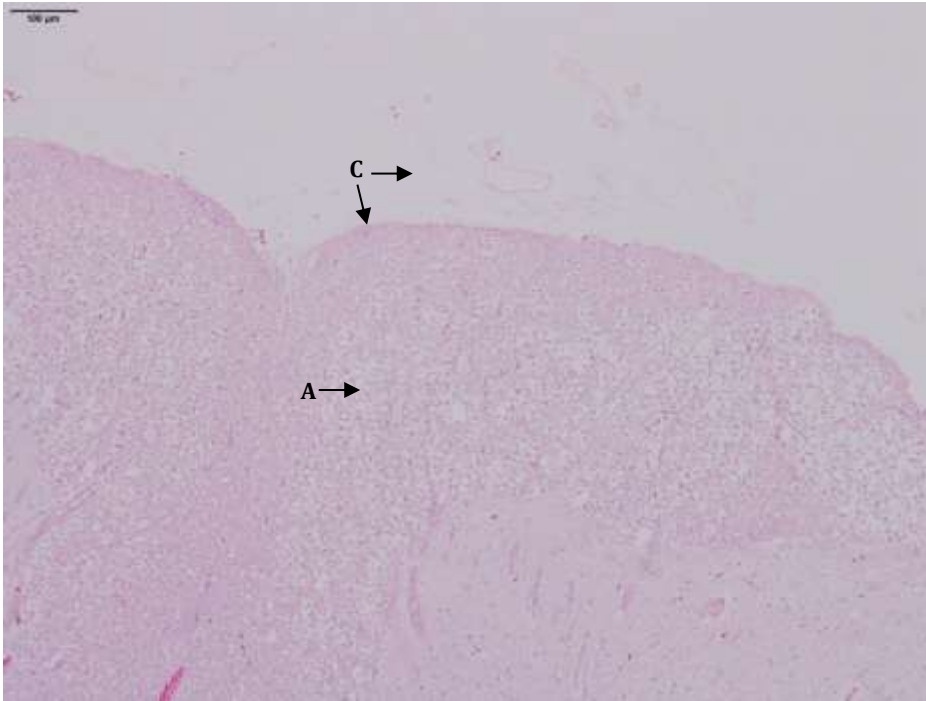
<b>Animal (letra)/ grupo</b>	<b>Resultado Histológico</b>
a / <b>G2</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário focal perivascular na pia- matér, região posterior. TN normal
b / <b>G2</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular (+++), com alguns plasmócitos no espaço Virchow- Robin. Foco de necrose com presença de histiócitos na substância branca da região central e anterior, reação inflamatória histiocitária ao redor do canal medular
c / <b>G2</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário(+) perivascular na pia-máter no espaço de Virchow-robin região posterior, meninges com infiltrado inflamatório linfocitário em pia-máter, região posterior. TN normal
d / <b>G2</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário (+) na pia-máter, região posterior. TN normal
e / <b>G2</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário (+) na pia-máter, região anterior, lateral e posterior. Foco de infiltrado inflamatório intraparenquimatoso
f / <b>G3</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular focal na pia- máter, região posterior. TN normal
g / <b>G3</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular focal na pia- máter, região posterior. TN normal
h / <b>G3</b>	Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular focal na pia- máter, região posterior. TN normal

TN – tecido nervoso, G – grupo

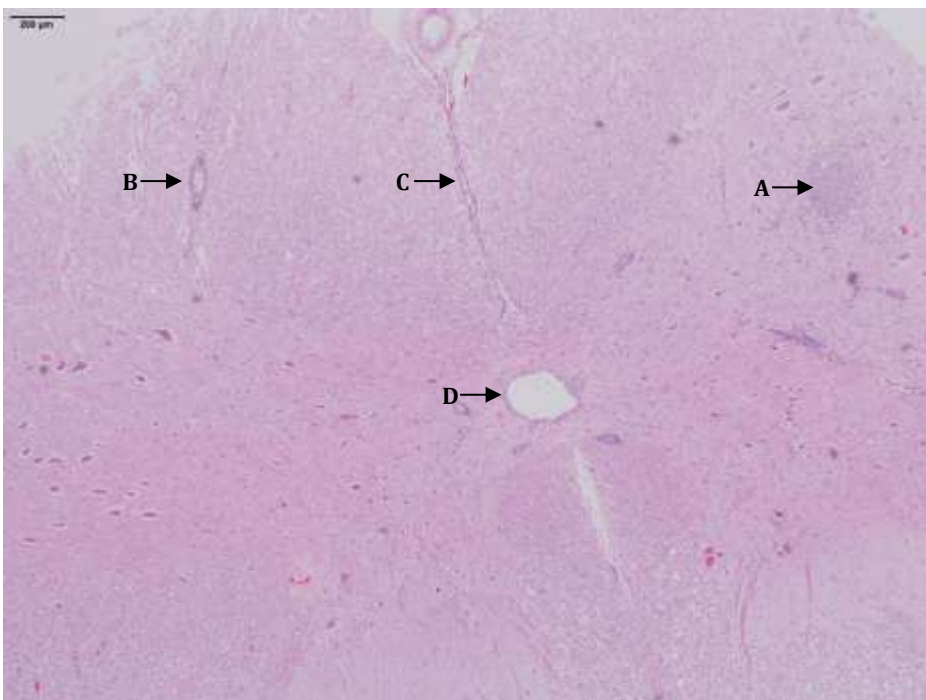
As figuras 1 e 2 mostram a histologia do tecido nervoso e meninges de animal do G1, sem alterações. As figuras 3 a 10 mostram o resultado da análise histológica do tecido nervoso, vasos e meninges de animais do grupo G2 (b e e) e do G3 (h).



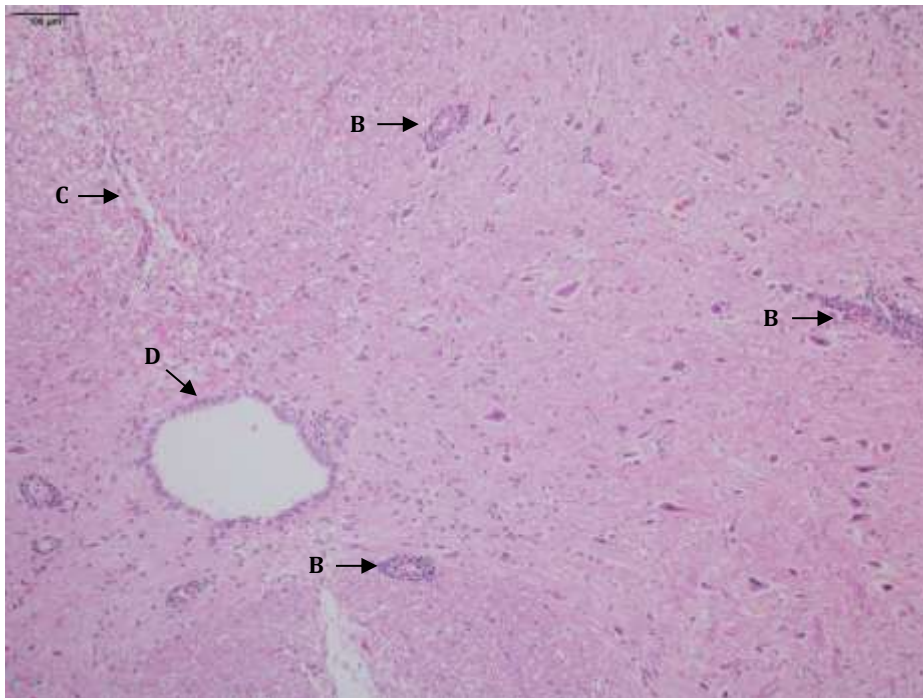
**Figura 1** – Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de animal do G1. H&E 10x.



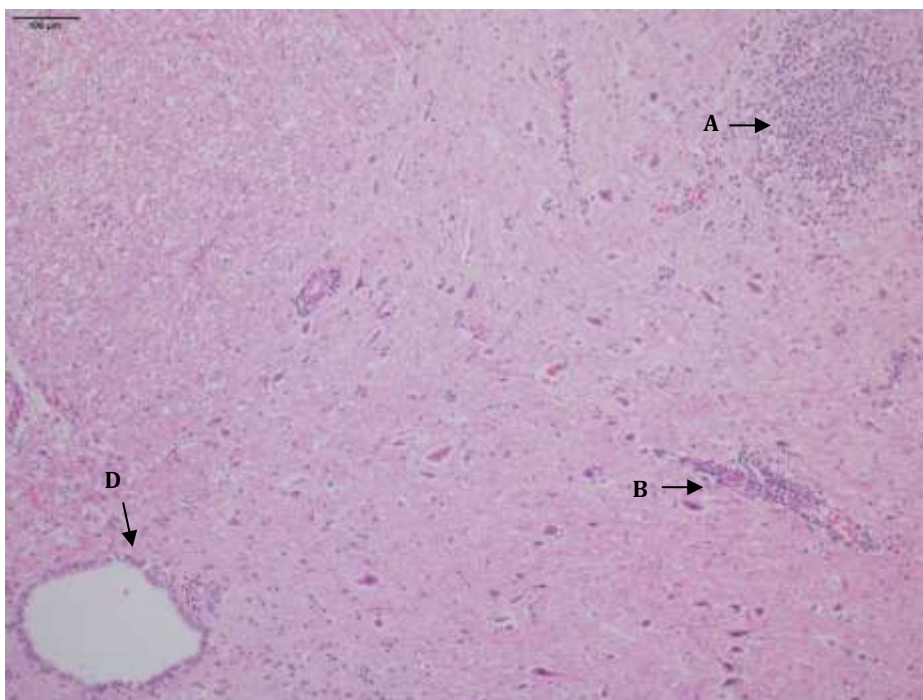
**Figura 2** – Tecido nervoso (A) e meninges (C) normais de animal do G1. H&E 40x.



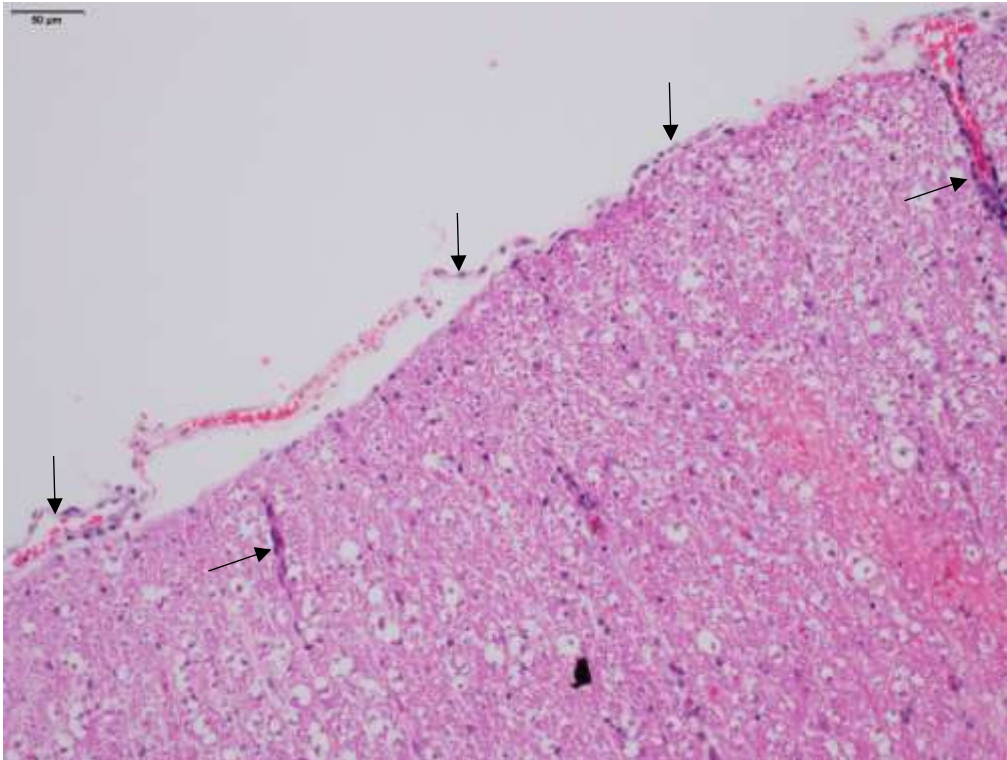
**Figura 3** – Infiltrado inflamatório perivascular linfocitário intraparenquimatoso (B) e no espaço de Virchow Robin (C), infiltrado inflamatório histiocitário intraparenquimatoso (A) e o redor do canal medular (D) de animal do G2(b). H&E 40x.



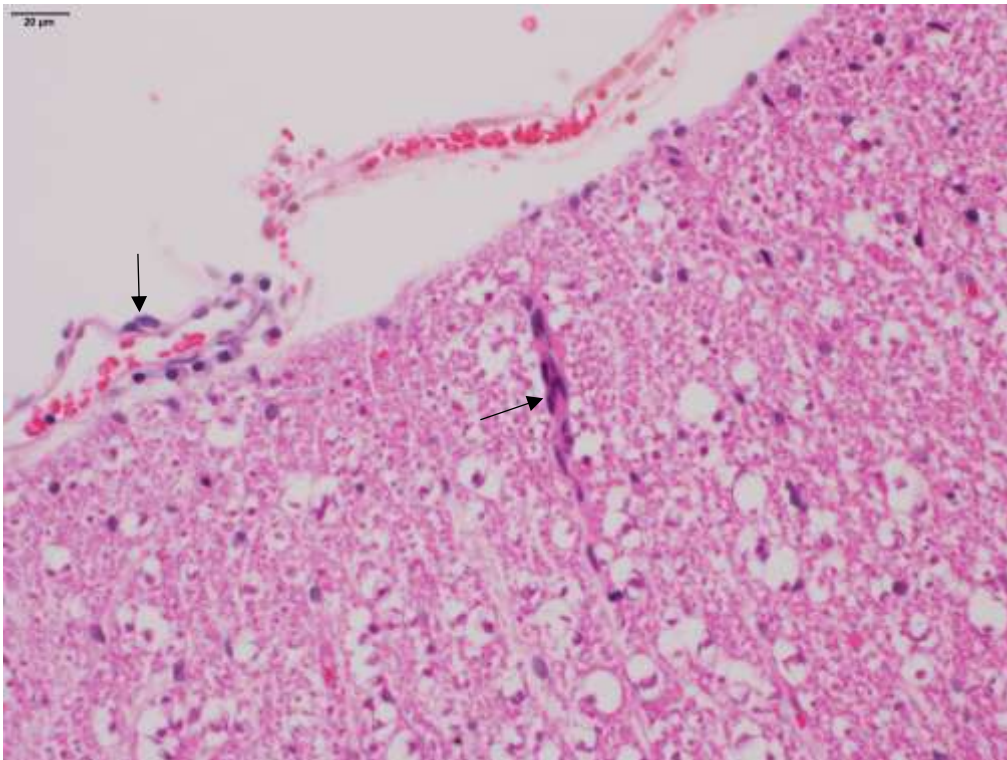
**Figura 4** – Infiltrado inflamatório perivascular linfocitário intraparenquimatoso (B) e no espaço de Virchow Robin (C) e o redor do canal medular (D) de animal do G2(b). H&E 100x.



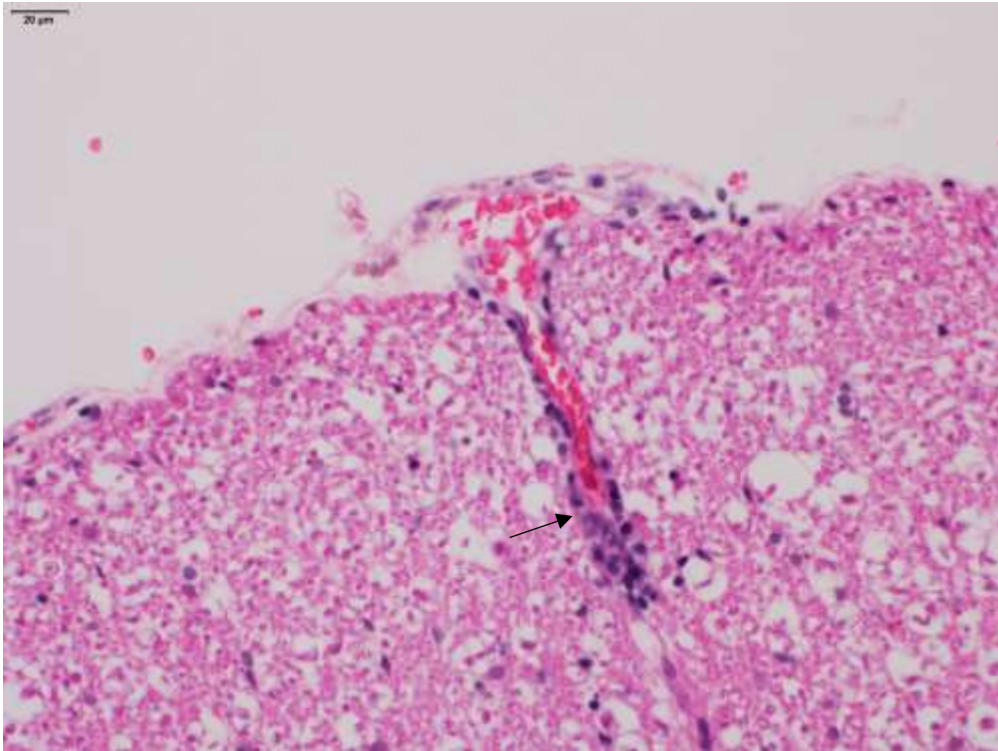
**Figura 5** – Infiltrado inflamatório perivascular linfocitário intraparenquimatoso (B), infiltrado inflamatório histiocitário intraparenquimatoso (A) e o redor do canal medular (D) de animal do G2(b). H&E 100x.



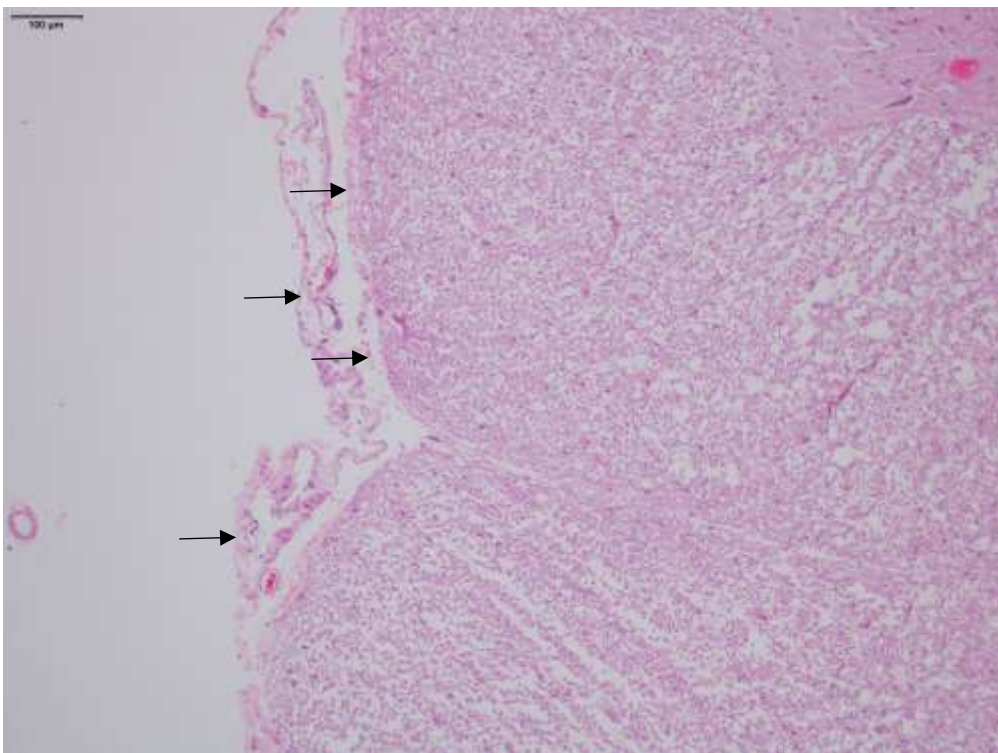
**Figura 6** – Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter de animal do G2 (e). HE 100x.



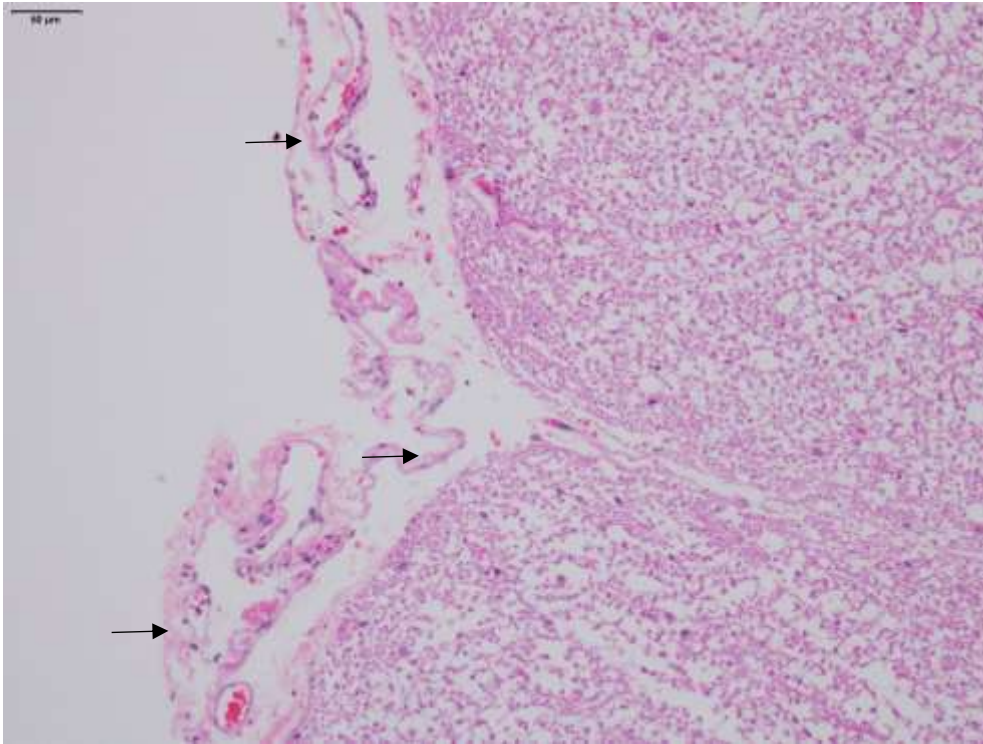
**Figura 7** – Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter de animal do G2 (e). HE 400x.



**Figura 8** – Infiltrado inflamatório linfocitário perivascular na pia-máter de animal do G2 (e). HE 400x.



**Figura 9** – Infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter e aracnoide de animal do G3 (h). HE 40x.



**Figura 10** – Infiltrado inflamatório perivascular na pia-máter e aracnoide de animal do G3 (h).  
HE 100x.



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Modelo experimental

Em modelos experimentais, com objetivo de estudar a influência de diversas soluções introduzidas no espaço subaracnoideo sobre o tecido nervoso e as meninges, é importante excluir a possibilidade de a punção subaracnoidea ser o fator determinante de lesões<sup>73</sup>.

O trauma causado pela punção lombossacra e injeção de soluções no espaço subaracnoideo pode gerar lesão fascicular e lesão neuronal nos nervos periféricos em coelhos<sup>74</sup>. Lesões neuronais como rotura, degeneração axonal distal (Walleriana) e regeneração desorganizada de fibras nervosas foram reportadas em ratos, após introdução direta de agulha em nervo periférico<sup>75</sup>.

De maneira a reduzir o risco de lesão neuronal causada por punções raquidianas, o correto posicionamento da agulha no espaço subaracnoideo é essencial para o sucesso de pesquisas em modelos experimentais. Com esta finalidade, a utilização da ultrassonografia em anestesia regional facilita a realização da técnica de punção, permitindo a melhor visibilidade das estruturas a serem abordadas (nervos), assim como das adjacentes (vasos sanguíneos, pulmão, pleura). Além de verificar o correto posicionamento da agulha no espaço subaracnoideo, possibilita a visibilidade da dispersão adequada da substância injetada<sup>71,73</sup>.

Um dos grupos selecionados na pesquisa (G1), recebeu solução salina pela via subaracnoidea, com a finalidade de averiguar se tal volume de solução, por si só, acarretaria lesão do tecido nervoso. Como descrito anteriormente, o espaço

subaracnoideo dos coelhos foi puncionado por entre a primeira e a segunda vértebra sacral, por via mediana. Sendo este um espaço bastante pequeno e ainda com tecido medular<sup>76</sup>, o volume administrado necessitava ser excluído como ser fator desencadeante de lesão neural.

Este grupo serviu ainda para excluir uma eventual injeção intraneural da solução. Há na literatura relatos 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<sup>74,75</sup>.

Os grupos G2 e G3 ambos receberam a injeção de Baclofeno, sendo 100 e 200 µg respectivamente, com o objetivo de avaliar efeitos que o fármaco determinaria sobre o tecido nervoso. As doses foram baseadas na dose máxima de 20 µg/kg em humanos e cálculo da dose equivalente animal (DEA), que correspondeu a 63 µg/kg<sup>66-68</sup>.

## **6.2 Discussão dos resultados**

Os resultados da presente pesquisa mostram que o baclofeno, independentemente da dose administrada, causou lesão de tecido nervoso e de meninges em 20% (n=8) dos coelhos estudados. As alterações histológicas foram predominantemente observadas na região posterior das meninges.

O Baclofeno é um agonista de receptores GABA tipo B<sup>15,77,78</sup>. Quando injetado pela via subaracnoidea liga-se aos receptores GABA-B nos gânglios da raiz dorsal e na substância cinzenta da medula, especialmente no corno dorsal da medula espinal nas lâminas I e II de Rexed<sup>3,16</sup>. Apesar do baclofeno ser fármaco levemente lipofílico<sup>13,22,79</sup>, apresenta dificuldade em ultrapassar a barreira hematoencefálica<sup>12</sup> das células ao longo do canal espinal, permanecendo, portanto, maior tempo no liquor<sup>12</sup> e próximo ao seu local

de injeção<sup>80</sup>. O Baclofeno é ativamente transportado por aminoácidos neutros e  $\beta$ -aminoácidos<sup>81</sup> por meio de sistema chamado L (LAT1 e LAT2 – large aminoacid transporter)<sup>82</sup>, presentes na barreira hematoencefálica, ainda assim apresenta baixa penetração no sistema nervoso central.

Existe uma zona não mielinizada na raiz posterior imediatamente antes da sua entrada na substância branca da região posterior da medula espinal, conhecida como zona de Obersteiner-Redlich (Zona OR) que contém neurônios desnudos. Parece que estes axônios são mais sensíveis a neurotoxicidade de fármacos introduzidos no neuroeixo<sup>83</sup>, como os anestésicos locais.

Conforme observado na presente pesquisa, lesão do tecido nervoso foi encontrada em 25% dos animais que apresentaram alterações histológicas nos tecidos do neuroeixo (dois coelhos dentre os oito). Estas foram observadas não somente na região posterior, como também na região central e anterior do tecido nervoso medular. Estes achados inferem que o mecanismo de lesão é diferente daquele desencadeado pelos anestésicos locais<sup>72,83</sup>, que além de dependentes da concentração<sup>72</sup>, primariamente localizados na região posterior.

As lesões do tecido nervoso pareceram ser secundárias a inflamação das meninges uma vez que estas se estenderam até o interior do parênquima medular. Em um dos animais o infiltrado inflamatório medular atingiu o espaço de Virchow-Robin, (prolongamento da pia-máter ao redor dos vasos, que percorre pequena extensão no interior do tecido nervoso), demonstrando a presença de neurotoxicidade em tecido profundo. De maneira similar em outro coelho no qual foi observado foco inflamatório intraparenquimatoso, a lesão meníngea foi mais extensa.

No presente trabalho as alterações histológicas observadas parecem não ser dose dependente e, como a solução foi sintetizada desprovida de preservativos ou conservantes, parece ser o baclofeno o agente causador das lesões histológicas nas meninges.

Os nossos resultados foram diferentes daqueles observados em cães, nos quais o potencial neurotóxico do baclofeno foi avaliado após 28 dias de infusão contínua por meio de cateter implantado cronicamente, do fármaco na dose de 200 µg ao dia. Os autores da pesquisa encontraram apenas reação fibrótica, classificada como leve, ao redor do cateter de todos os animais estudados (grupo controle e tratado) e concluíram que o fármaco era inócuo ao tecido nervoso<sup>45</sup>.

Uma das explicações para a discrepância dos resultados é que, no cão, a quantidade de líquido presente no espaço subaracnoideo é maior do que no coelho, o que permite melhor diluição do fármaco, podendo resultar em doses menores em contato com as estruturas do neuroeixo. No coelho, a quantidade de líquido além de menor, inclusive seu refluxo através da agulha de punção dificilmente ocorre<sup>47</sup>, o espaço mais caudal onde se consegue introduzir a agulha de punção ainda contém o cone medular<sup>76</sup>. Além disso, o baclofeno é eliminado mais lentamente na medula<sup>22</sup> e possui tendência a não dispersão fora do local de punção. Estes fatores podem ter favorecido o maior contato do fármaco com as meninges e desencadeado as lesões histológicas, no estudo atual.

### **6.3 Limitações do estudo**

A pequena quantidade de líquido presente no espaço subaracnoideo de coelhos pode ter superestimado os resultados histológicos obtidos, sendo uma limitação deste trabalho.

Não obstante, pesquisas utilizando outros fármacos pela via subaranoidea nessa espécie de animal já foram realizadas sem desencadear lesões neurológicas.

## **7 CONCLUSÃO**

Podemos concluir que neste modelo experimental em coelhos o baclofeno desencadeou reação inflamatória no tecido nervoso e nas meninges.

## 8 REFERÊNCIAS

1. Kheder A, Nair KP. Spasticity: pathophysiology, evaluation and management. *Pract Neurol* 2012;12:289-98.
2. Bethoux F. Spasticity Management After Stroke. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2015;26:625-39.
3. Li Y, Li X, Harvey PJ, Bennett DJ. Effects of baclofen on spinal reflexes and persistent inward currents in motoneurons of chronic spinal rats with spasticity. *J Neurophysiol* 2004;92:2694-703.
4. Martin A, Abogunrin S, Kurth H, Dinet J. Epidemiological, humanistic, and economic burden of illness of lower limb spasticity in adults: a systematic review. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014;10:111-22.
5. Nogueira LA, Nobrega FR, Lopes KN, Thuler LC, Alvarenga RM. The effect of functional limitations and fatigue on the quality of life in people with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 2009;67:812-7.
6. Voerman GE, Erren-Wolters CV, Fleuren JF, Hermens HJ, Geurts AC. Perceived spasticity in chronic spinal cord injured patients: associations with psychological factors. *Disabil Rehabil* 2010;32:775-80.
7. Denno MS, Gillard PJ, Graham GD, et al. Anxiety and depression associated with caregiver burden in caregivers of stroke survivors with spasticity. *Arch Phys Med Rehabil* 2013;94:1731-6.
8. Wissel J, Manack A, Brainin M. Toward an epidemiology of poststroke spasticity. *Neurology* 2013;80:S13-9.
9. Nair KP, Marsden J. The management of spasticity in adults. *Bmj* 2014;349:g4737.
10. Flachenecker P, Henze T, Zettl UK. Spasticity in patients with multiple sclerosis--clinical characteristics, treatment and quality of life. *Acta Neurol Scand* 2014;129:154-62.

11. Radhakrishnan H. Baclofen-induced neurotoxicity in a patient with end-stage renal disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2016;27:595-7.
12. Leisen C, Langguth P, Herbert B, Dressler C, Koggel A, Spahn-Langguth H. Lipophilicities of baclofen ester prodrugs correlate with affinities to the ATP-dependent efflux pump P-glycoprotein: relevance for their permeation across the blood-brain barrier? *Pharm Res* 2003;20:772-8.
13. Wu VC, Lin SL, Lin SM, Fang CC. Treatment of baclofen overdose by haemodialysis: a pharmacokinetic study. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:441-3.
14. Roberts JK, Westphal S, Sparks MA. Iatrogenic Baclofen Neurotoxicity in ESRD: Recognition and Management. *Semin Dial* 2015;28:525-9.
15. Heetla HW, Staal MJ, Proost JH, van Laar T. Clinical relevance of pharmacological and physiological data in intrathecal baclofen therapy. *Arch Phys Med Rehabil* 2014;95:2199-206.
16. Yang K, Wang D, Li YQ. Distribution and depression of the GABA(B) receptor in the spinal dorsal horn of adult rat. *Brain Res Bull* 2001;55:479-85.
17. Faigle JW, Keberle H. The chemistry and kinetics of Lioresal. *Postgrad Med J* 1972;48:Suppl 5:9-13.
18. Wuis EW, Dirks MJ, Termond EF, Vree TB, Van der Kleijn E. Plasma and urinary excretion kinetics of oral baclofen in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1989;37:181-4.
19. Yamashita A, Matsumoto M, Matsumoto S, Itoh M, Kawai K, Sakabe T. A comparison of the neurotoxic effects on the spinal cord of tetracaine, lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine administered intrathecally in rabbits. *Anesth Analg* 2003;97:512-9.
20. Ertzgaard P, Campo C, Calabrese A. Efficacy and safety of oral baclofen in the management of spasticity: A rationale for intrathecal baclofen. *J Rehabil Med* 2017;49:193-203.



21. Chen KS, Bullard MJ, Chien YY, Lee SY. Baclofen toxicity in patients with severely impaired renal function. *Ann Pharmacother* 1997;31:1315-20.
22. Ijaz M, Tariq H, Kashif M, Marquez JG. Encephalopathy and hypotonia due to baclofen toxicity in a patient with end-stage renal disease. *Am J Case Rep* 2015;16:232-5.
23. Dang DH, Carter AL, Olin JL, Velasco JC. Baclofen-induced encephalopathy in an older patient with stage 2 chronic kidney disease. *J Am Pharm Assoc* (2003) 2015;55:117-8.
24. Cardoso AL, Quintaneiro C, Seabra H, Teixeira C. Cardiac arrest due to baclofen withdrawal syndrome. *BMJ Case Rep* 2014;2014.
25. Awuor SO, Kitei PM, Nawaz Y, Ahnert AM. Intrathecal baclofen withdrawal: A rare cause of reversible cardiomyopathy. *Acute Card Care* 2016;18:13-7.
26. Penn RD, Kroin JS. Intrathecal baclofen alleviates spinal cord spasticity. *Lancet* 1984;1:1078.
27. Coffey JR, Cahill D, Steers W, et al. Intrathecal baclofen for intractable spasticity of spinal origin: results of a long-term multicenter study. *J Neurosurg* 1993;78:226-32.
28. Azouvi P, Mane M, Thiebaut JB, Denys P, Remy-Neris O, Bussel B. Intrathecal baclofen administration for control of severe spinal spasticity: functional improvement and long-term follow-up. *Arch Phys Med Rehabil* 1996;77:35-9.
29. Albright AL, Gilmartin R, Swift D, Krach LE, Ivanhoe CB, McLaughlin JF. Long-term intrathecal baclofen therapy for severe spasticity of cerebral origin. *J Neurosurg* 2003;98:291-5.
30. Morton RE, Gray N, Vloeberghs M. Controlled study of the effects of continuous intrathecal baclofen infusion in non-ambulant children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2011;53:736-41.

31. Margetis K, Korfias S, Boutos N, et al. Intrathecal baclofen therapy for the symptomatic treatment of hereditary spastic paraplegia. *Clin Neurol Neurosurg* 2014;123:142-5.
32. Scannell B, Yaszay B. Scoliosis, spinal fusion, and intrathecal baclofen pump implantation. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2015;26:79-88.
33. Hoving MA, van Raak EP, Spincemaille GH, Palmans LJ, Becher JG, Vles JS. Efficacy of intrathecal baclofen therapy in children with intractable spastic cerebral palsy: a randomised controlled trial. *Eur J Paediatr Neurol* 2009;13:240-6.
34. McClelland S, 3rd, Bethoux FA, Boulis NM, et al. Intrathecal baclofen for spasticity-related pain in amyotrophic lateral sclerosis: efficacy and factors associated with pain relief. *Muscle Nerve* 2008;37:396-8.
35. Koulousakis A, Kuchta J. Intrathecal antispastic drug application with implantable pumps: results of a 10 year follow-up study. *Acta Neurochir Suppl* 2007;97:181-4.
36. Ivanhoe CB, Francisco GE, McGuire JR, Subramanian T, Grissom SP. Intrathecal baclofen management of poststroke spastic hypertonia: implications for function and quality of life. *Arch Phys Med Rehabil* 2006;87:1509-15.
37. Krach LE. Pharmacotherapy of spasticity: oral medications and intrathecal baclofen. *J Child Neurol* 2001;16:31-6.
38. Stroud J, Scattoloni J, Blasingim M, Nafiu OO. Intrathecal baclofen toxicity: an unusual cause of paediatric postoperative coma and respiratory depression. *Eur J Anaesthesiol* 2014;31:334-6.
39. Yeh RN, Nypaver MM, Deegan TJ, Ayyangar R. Baclofen toxicity in an 8-year-old with an intrathecal baclofen pump. *J Emerg Med* 2004;26:163-7.
40. Shirley KW, Kothare S, Piatt JH, Jr., Adirim TA. Intrathecal baclofen overdose and withdrawal. *Pediatr Emerg Care* 2006;22:258-61.

41. Tunali Y, Hanimoglu H, Tanriverdi T, Hanci L, Hanci M. Intrathecal baclofen toxicity and deep coma in minutes. *J Spinal Cord Med* 2006;29:237-9.
42. Srivastava S, Hoon A, Ogborn J, Johnston M. Acute onset rhythmic hiccup-like respirations secondary to oral baclofen toxicity. *Pediatr Neurol* 2014;51:252-4.
43. Bassilios N, Launay-Vacher V, Mercadal L, Deray G. Baclofen neurotoxicity [correction of unerotoxicity] in a chronic haemodialysis patient. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:715-6.
44. Lee J, Shin HS, Jung YS, Rim H. Two cases of baclofen-induced encephalopathy in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. *Ren Fail* 2013;35:860-2.
45. Sabbe MB, Grafe MR, Pfeifer BL, Mirzai TH, Yaksh TL. Toxicology of baclofen continuously infused into the spinal intrathecal space of the dog. *Neurotoxicology* 1993;14:397-410.
46. Bieter RN, Cunningham RW, Lenz AO, McNearney JJ. Threshold anesthetic and lethal concentration of certain spinal anesthetics in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1936;57:221-44.
47. Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, Austin E, Sumi SM. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology* 1985;63:364-70.
48. Malinovsky JM, Charles F, Baudrimont M, et al. Intrathecal ropivacaine in rabbits: pharmacodynamic and neurotoxicologic study. *Anesthesiology* 2002;97:429-35.
49. Oka S, Matsumoto M, Ohtake K, Kiyoshima T, Nakakimura K, Sakabe T. The addition of epinephrine to tetracaine injected intrathecally sustains an increase in glutamate concentrations in the cerebrospinal fluid and worsens neuronal injury. *Anesth Analg* 2001;93:1050-7.
50. Kaneko S, Matsumoto M, Tsuruta S, Hirata T, Gondo T, Sakabe T. The nerve root entry zone is highly vulnerable to intrathecal tetracaine in rabbits. *Anesth Analg* 2005;101:107-14, table of contents.

51. Adams HJ, Mastri AR, Eicholzer AW, Kilpatrick G. Morphologic effects of intrathecal etidocaine and tetracaine on the rabbit spinal cord. *Anesth Analg* 1974;53:904-8.
52. Wang BC, Hillman DE, Spielholz NI, Turndorf H. Chronic neurological deficits and Nesacaine-CE--an effect of the anesthetic, 2-chloroprocaine, or the antioxidant, sodium bisulfite? *Anesth Analg* 1984;63:445-7.
53. 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;88:56-62.
54. Hashimoto K, Karasawa F, Satoh T. Intrathecal midazolam attenuates renal sympathetic nerve activity in rabbits. *Masui* 1997;46:1059-65.
55. Demirel E, Ugur HC, Dolgun H, et al. The neurotoxic effects of intrathecal midazolam and neostigmine in rabbits. *Anaesth Intensive Care* 2006;34:218-23.
56. Borgbjerg FM, Svensson BA, Frigast C, Gordh T, Jr. Histopathology after repeated intrathecal injections of preservative-free ketamine in the rabbit: a light and electron microscopic examination. *Anesth Analg* 1994;79:105-11.
57. Vranken JH, Troost D, de Haan P, et al. Severe toxic damage to the rabbit spinal cord after intrathecal administration of preservative-free S(+)-ketamine. *Anesthesiology* 2006;105:813-8.
58. Saeki H, Matsumoto M, Kaneko S, et al. Is intrathecal magnesium sulfate safe and protective against ischemic spinal cord injury in rabbits? *Anesth Analg* 2004;99:1805-12, table of contents.
59. DeLeo JA, Colburn RW, Rickman AJ, Yeager MP. Intrathecal catheterization alone induces neuroimmune activation in the rat. *Eur J Pain* 1997;1:115-22.
60. Long JB, Petras JM, Mobley WC, Holaday JW. Neurological dysfunction after intrathecal injection of dynorphin A (1-13) in the rat. II. Nonopioid mechanisms

mediate loss of motor, sensory and autonomic function. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;246:1167-74.

61. Dirksen R, Lerou J, Nijhuis GM, Booij LH, Jurna I. Intrathecal somatostatin produces effects dependent on the interval between catheter implantation and drug injection. *Life Sci* 1990;47:1347-54.
62. Madsen JB, Jensen FM, Faber T, Bille-Hansen V. Chronic catheterization of the epidural space in rabbits: a model for behavioural and histopathological studies. Examination of meptazinol neurotoxicity. *Acta Anaesthesiol Scand* 1993;37:307-13.
63. Grip G, Svensson BA, Gordh T, Jr., Post C, Hartvig P. Histopathology and evaluation of potentiation of morphine-induced antinociception by intrathecal droperidol in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand* 1992;36:145-52.
64. Brock-Utne JG, Mankowitz E, Kallichurum S, Downing JW. Effects of intrathecal saline and ketamine with and without preservative on the spinal nerve roots of monkeys. *S Afr Med J* 1982;61:360-1.
65. Myers RR, Sommer C. Methodology for spinal neurotoxicity studies. *Reg Anesth* 1993;18:439-47.
66. Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 2016;7:27-31.
67. Kim TH, Park GY, Shin S, et al. Pharmacokinetic alteration of baclofen by multiple oral administration of herbal medicines in rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014;2014:402126.
68. Thomson K, Tey D, Marks M. *Paediatric Handbook*. Eighth Edition ed: Blackwell Publishing Ltd.; 2009.
69. Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurologic outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology* 1989;70:64-70.

70. MasSantos ALQ, Lima EMM, Santana MIS. Length of spinal cord and topography of medular cone in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Biosc J (UFU)* 1999;15:45-62.
71. Antonakakis JG, Ting PH, Sites B. Ultrasound-guided regional anesthesia for peripheral nerve blocks: an evidence-based outcome review. *Anesthesiol Clin* 2011;29:179-91.
72. Pires SR, Ganem EM, Marques M, Castiglia YM. Effects of increasing spinal hyperbaric lidocaine concentrations on spinal cord and meninges: experimental study in dogs. *Rev Bras Anesthesiol* 2006;56:253-62.
73. Pereira ID, Vital RB, Silva R, et al. Ultrasound as a safe and reliable guidance for subarachnoid puncture in rabbits. *Acta Cir Bras* 2017;32:14-21.
74. Selander D, Brattsand R, Lundborg G, Nordborg C, Olsson Y. Local anesthetics: 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 of bupivacaine (Marcain). *Acta Anaesthesiol Scand* 1979;23:127-36.
75. 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;69:433-8.
76. Santos AL, Lima EM, Santana MIS. Length of spinal cord and topography of medular cone in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Bioscience Journal* 1999;15:45-62.
77. Mezler M, Muller T, Raming K. Cloning and functional expression of GABA(B) receptors from *Drosophila*. *Eur J Neurosci* 2001;13:477-86.
78. Dzitoyeva S, Dimitrijevic N, Manev H. Gamma-aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in *Drosophila*: adult RNA interference and pharmacological evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5485-90.

79. Porter LM, Merrick SS, Katz KD. Baclofen Toxicity in a Patient with Hemodialysis-Dependent End-Stage Renal Disease. *J Emerg Med* 2017;52:e99-e100.
80. Bernards CM. Cerebrospinal fluid and spinal cord distribution of baclofen and bupivacaine during slow intrathecal infusion in pigs. *Anesthesiology* 2006;105:169-78.
81. Moll-Navarro MJ, Merino M, Casabo VG, Nacher A, Polache A. Interaction of taurine on baclofen intestinal absorption: a nonlinear mathematical treatment using differential equations to describe kinetic inhibition models. *J Pharm Sci* 1996;85:1248-54.
82. Kido Y, Tamai I, Uchino H, Suzuki F, Sai Y, Tsuji A. Molecular and functional identification of large neutral amino acid transporters LAT1 and LAT2 and their pharmacological relevance at the blood-brain barrier. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:497-503.
83. Takenami T, Yagishita S, Asato F, Hoka S. Neurotoxicity of intrathecally administered tetracaine commences at the posterior roots near entry into the spinal cord. *Reg Anesth Pain Med* 2000;25:372-9.