



**Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Flávia Maria Leite Virgínio dos Santos

**EFEITOS DO PARECOXIBE SUBARACNOIDEO SOBRE A MEDULA
ESPINAL E AS MENINGES DE COELHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, para obtenção do título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Professora Titular Doutora Eliana Marisa Ganem

**Botucatu
2018**

Flávia Maria Leite Virgínio dos Santos

**EFEITOS DO PARECOXIBE SUBARACNOIDEO SOBRE A MEDULA
ESPINAL E AS MENINGES DE COELHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, para obtenção do título de Doutor em Anestesiologia.

Orientadora: Professora Titular Doutora Eliana Marisa Ganem

**Botucatu
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Santos, Flávia Maria Leite Virginio dos.
Efeitos do parecoxibe subaracnoideo sobre a medula
espinal e as meninges de coelhos / Flávia Maria Leite
Virginio dos Santos. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Eliana Marisa Ganem
Capes: 40102130

1. Coelho como animal de laboratório. 2. Agentes
anti-inflamatórios. 3. Toxicologia. 4. Meninges. 5. Medula
espinal.

Palavras-chave: Coelho; Injeção subaracnoidea;
Neurotoxicidade; Parecoxibe; Toxicidade meníngea.

Dedicatória

“Viver feliz não é mais do que viver com honestidade e retidão.”

Cícero

À minha família, que sempre apoiou irrestritamente meus projetos e por diversas vezes preteriram seus próprios planos e sonhos para tornar os meus possíveis.

Aos mestres do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu que contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Agradecimento Especial

À Professora Titular Doutora Eliana Marisa Ganem, por toda a orientação, paciência, carinho e bondade. Obrigada pelos conselhos, não só profissionais. Por fim, é admirável a sua dedicação à essa linha de pesquisa.

Agradecimentos

“Eu sou parte de uma equipe. Então quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma, termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas.”

Ayrton Senna

Aos Docentes do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por serem mestres na essência da palavra.

Aos meus colegas e amigos do Departamento de Anestesiologia do Hospital Amaral Carvalho, que muitas vezes foram sobrecarregados com a minha ausência, para que fosse possível cumprir os prazos para a confecção dessa tese.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo apoio e assistência prestada sempre prontamente.

À Professora Adjunta Mariângela Esther Alencar Marques, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela orientação e auxílio no diagnóstico histológico.

À Tatiane de Fátima Pineiz, secretária do Programa de Pós – Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por todo o auxílio.

À Ludmilla Gerios, graduanda do curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

Ao CNPQ por todo o auxílio financeiro necessário para o desenvolvimento desse estudo.

Às funcionárias da Biblioteca do Campus de Botucatu, pela revisão bibliográfica e elaboração da ficha catalográfica.

Aos funcionários do Laboratório Experimental pela colaboração imprescindível na execução do trabalho prático.

Resumo

Efeitos do parecoxibe subaracnoideo sobre a medula espinal e as meninges de coelhos

Introdução: O parecoxibe, um pró-fármaco hidrolisado à valdecoxibe, é um antagonista da COX-2 com intensa atividade anti-inflamatória e analgésica. Embora muitos estudos tenham sido realizados indicando a eficácia dos antagonistas da COX em aliviar o processo da dor, quase nada foi estudado sobre a toxicidade desses fármacos no neuroeixo. **Objetivos:** O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos que diferentes doses de parecoxibe, administrado pela via subaracnoidea, em punção única, determinariam sobre a medula espinal e as meninges de coelhos. **Metodologia:** Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, 30 coelhos adultos jovens, da raça grupo genético de Botucatu, com pesos entre 2510 g e 3560 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu, foram randomizados em três grupos: grupo S – solução salina a 0,9%, grupo P₄ – parecoxibe (dose: 4 mg) e grupo P₈ – parecoxibe (dose: 8 mg). Após a anestesia intravenosa com xilazina e cetamina os animais foram submetidos à punção subaracnoidea guiada por ultrassom, com agulha de Quincke 25G, no espaço entre primeira e a segunda vértebras sacrais e realizada a injeção de uma das soluções previamente sorteadas em volume de 0,4 mL (10 µL por centímetro de medula espinal medida entre a base do crânio e o espaço lombossacral). Após a recuperação da anestesia e por 21 dias, os animais foram avaliados quanto à sensibilidade e à motricidade. Em seguida, foram sacrificados por decapitação e retiradas as porções lombar e sacral da medula espinal e as raízes da cauda equina para exame histológico por microscopia óptica. **Resultados:** Dois animais foram excluídos do experimento por dificuldade na técnica de punção. No grupo S, nenhum coelho apresentou alterações clínicas ou histológicas no tecido nervoso, vasos sanguíneos ou meninges. No P₄, cinco coelhos apresentaram alterações histológicas dos tecidos do neuroeixo, principalmente infiltrado inflamatório perivascular nas meninges. No P₈, seis animais apresentaram alterações histológicas, em dois coelhos deste grupo observou-se foco de necrose no tecido nervoso e áreas de aderências entre a pia-máter e aracnoide, com manifestação clínica de paralisia das patas posteriores e sensibilidade dolorosa diminuída na mesma região. **Limitação:** O espaço subaracnoideo do coelho tem diminuta quantidade de liquor, favorecendo a menor diluição do fármaco no mesmo e a maior concentração da solução em contato com o tecido nervoso e meninges, o que poderia exacerbar os efeitos deletérios da medicação. **Conclusão:** Neste modelo experimental de coelhos, diferentes doses de parecoxibe, em injeção única, administradas pela via subaracnoidea, determinaram alterações histológicas sobre a medula espinal e as meninges.

Palavras-chave: coelho; injeção subaracnoidea; parecoxibe; meninges; medula espinal; neurotoxicidade; AINES.

Effects of Subarachnoid Parecoxib on the Spinal Cord and Meninges of Rabbits

Abstract

Background: Parecoxib, a pro-drug that is hydrolyzed to valdecoxib, is a COX-2 antagonist with strong anti-inflammatory and analgesic activity. Although many studies have demonstrated the efficacy of COX antagonists in relieving pain, almost nothing is known about the toxicity of these drugs when administered into the neuraxis. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate the effects of a single injection of different doses of parecoxib into the subarachnoid space on the spinal cord and meninges of rabbits. **Methods:** After approval by the Ethics Committee on Animal Use, 30 young adult rabbits of the Botucatu genetic group weighing 2,510 to 3,560 g, were randomized into three groups: group S - 0.9% saline; group P₄ – parecoxib (dose: 4 mg); group P₈ – parecoxib (dose: 8 mg). After intravenous anesthesia with xylazine and ketamine, the animals underwent ultrasound-guided subarachnoid puncture with a Quincke 25G needle in the space between the first and second sacral vertebrae and the injection of one of the previously established solutions was performed in a volume of 0.4 mL (10 µL per cm of spinal cord measured from the skull base to the lumbosacral space). After recovery from anesthesia, the animals were evaluated regarding sensitivity and motor function for 21 days. After this period, the animals were sacrificed by decapitation and the lumbar and sacral portions of the spinal cord and the roots of the cauda equina were removed for histological examination by light microscopy. **Results:** In group S, none of the rabbits exhibited clinical or histological alterations in nervous tissue, blood vessels or meninges. In group P₄, histological alterations were found in tissues of the neuraxis in five animals, especially a perivascular inflammatory infiltrate in the meninges. In group P₈, histological alterations were observed in six animals. In two rabbits of this group (P₈), we observed necrotic foci in nervous tissue and areas of adhesions between the pia mater and arachnoid, with clinical manifestations of hindlimb paralysis and reduced pain sensitivity in the same region. **Limitations:** The fact that the arachnoid space of the rabbit contains a small volume of cerebrospinal fluid may result in lower dilution of the drug and a higher concentration of the solution in contact with nervous tissue and meninges, thus exacerbating the deleterious effects of the drug. **Conclusion:** In this rabbit model, the single injection of different doses of parecoxib into the subarachnoid space caused histological alterations in the spinal cord and meninges.

Keywords: *Parecoxib; rabbits; intraspinal injections; meninges; spinal cord; spinal anesthesia; neurotoxicity syndromes; NSAIDs.*

Lista de abreviações

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
CEUA	COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
LXA₄	Lipoxina A ₄
NK-1	Neurocinina-1
NMDA	N-metil-D-aspartato
PGs	Prostaglandinas
PTGS	Prostaglandina-endoperóxido sintase
SNC	Sistema nervoso central
TDI	Tissue Doppler Imaging
TGF-β	Transforming growth factor beta
TXA₂	Tromboxane A ₂
WDR	Wide Dynamic Range

Lista de Tabelas

Tabela 1: Peso (g) e comprimento de medula (cm) dos animais pertencentes aos três grupos experimentais. Resultados expressos em média e desvio padrão com $P < 0,05$	30
Tabela 2: Resultados histológicos dos animais pertencentes ao P ₄	31
Tabela 3: Resultados histológicos dos animais pertencentes ao P ₈	32

Lista de figuras

- Figura 1: Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges normais (C) de animal nº 9 pertencente ao grupo S. HE 40x.33
- Figura 2: Necrose na região central das substâncias branca e cinzenta (A), dura-máter normal (B), Infiltrado inflamatório perivascular e difuso na aracnoide e pia-máter(C), trombose em vaso aracnoideo (D) de animal nº 5 pertencente ao P₄. HE 40x.34
- Figura 3: Dura-máter normal (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular e difuso na aracnoide e pia-máter (B), trombose em vaso aracnoideo (C) de animal nº 5 pertencente ao P₄. HE 100x.35
- Figura 4: Necrose de tecido nervoso em região póstero-lateral (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular e difuso pelas meninges (B), aderências entre a pia-máter e aracnoide (C) de animal nº 1 pertencente ao P₈. HE 40x.....36
- Figura 5: Infiltrado inflamatório linfoplasmocitátio perivascular (A) e adesão entre a aracnoide e pia-máter (B) de animal nº 1 pertencente ao P₈. HE 100x.....37
- Figura 6 - Tecido nervoso: focos de necrose em região anterior e antero-lateral (A), aderências entre a pia-máter e aracnoide (B), infiltrado inflamatório perivascular em meninges (C). de animal nº 2 pertencente ao P₈. HE 40x.....38
- Figura 7: Foco de necrose de tecido nervoso (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e aderências entre a pia-máter e aracnoide (B) de animal nº 2 pertencente ao P₈. HE 100x.....39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 HIPÓTESE	19
3 OBJETIVO	20
4 MÉTODO	21
4.1 ANIMAIS UTILIZADOS.....	21
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	21
4.3 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL.....	21
4.4 TÉCNICAS UTILIZADAS.....	22
4.4.1 Preparo do animal	22
4.5 ANESTESIA SUBARACNOIDEA	23
4.5.1 Técnica de punção	23
4.6 VOLUME INJETADO.....	24
4.7 SOLUÇÃO ADMINISTRADA.....	24
4.8 OBSERVAÇÃO CLÍNICA	24
4.9 SACRIFÍCIO.....	25
4.10 EXAME HISTOLÓGICO	25
4.11 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL (CEUA).....	28
4.12 MODELO DE ESTUDO	28
4.13 MÉTODO ESTATÍSTICO	29
4.13.1 Tamanho amostral	29
5 RESULTADOS	30
6 DISCUSSÃO	40
6.1 DISCUSSÃO DA METODOLOGIA.....	40
6.1.1 Ultrassonografia como guia de punção	40
6.1.2 Grupos experimentais	41
6.1.2.1 Justificativa para composição dos grupos experimentais	41
6.1.2.2 Volume da solução administrada	42
6.1.2.3 Dose da solução administrada	42
6.1.2.4 Tempo de observação clínica no cativeiro	43
6.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	43
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

As primeiras descrições das características clínicas da inflamação são observadas em papiros egípcios datados de aproximadamente 3000 a.C., porém, foi no século I d.C. que o escritor romano Celso listou os quatro sinais cardinais da inflamação (rubor, tumor, calor e dor), sendo complementado por Virchow que adicionou um quinto sinal clínico, a perda de função (*functio laesa*)^{1, 2}.

A inflamação é reação complexa desencadeada por vários agentes nocivos e consiste de respostas vasculares e celulares, podendo haver manifestações sistêmicas.

A resposta inflamatória está intimamente relacionada ao processo de reparo tecidual por meio da regeneração de células do parênquima nativo ou pela cicatrização, na qual o tecido danificado é preenchido por fibrose. Portanto, a inflamação é fundamentalmente um mecanismo de defesa, cujo objetivo é a eliminação da causa inicial da lesão celular³.

As reações vasculares e celulares decorrentes das inflamações aguda e crônica são mediadas por fatores químicos derivados de proteínas ou células plasmáticas e, são produzidas ou ativadas pelo estímulo inflamatório. Esses mediadores amplificam a resposta inflamatória e influenciam sua evolução. A inflamação termina quando o agente agressor é eliminado e os mediadores são destruídos ou dispersos. Somam-se a estes fatores mecanismos anti-inflamatórios ativos que visam controlar a resposta inflamatória e evitar que ela cause dano excessivo ao hospedeiro³.

A inflamação aguda é resposta rápida a agentes agressores como infecções (bacterianas, virais ou parasitárias), toxinas microbianas, traumas, agentes físicos e químicos (lesão térmica, radiação, substâncias químicas), necrose tissular, corpos estranhos e reações imunológicas. Os três principais componentes característicos da inflamação aguda são as alterações no calibre vascular (aumento de fluxo sanguíneo), as alterações estruturais na microcirculação (aumento da permeabilidade vascular) e a migração dos leucócitos (acúmulo e ativação das células de defesa)⁴.

Os fenômenos vasculares desempenham papel importante na cascata da inflamação aguda, possibilitando que anticorpos e leucócitos atinjam o local da agressão tecidual. Variações no fluxo e calibre dos vasos se iniciam logo após a lesão.

A vasodilatação é uma das primeiras manifestações da inflamação aguda, podendo ser precedida de vasoconstrição transitória de curta duração. A dilatação vascular envolve primeiro as arteríolas, seguida de abertura de novos leitos capilares levando a aumento do fluxo sanguíneo local, causando, na maioria das vezes, manifestações clínicas conhecidas como sinais cardinais da inflamação (calor e rubor)⁵.

O aumento do calibre dos vasos sanguíneos é induzido por mediadores que atuam na musculatura lisa vascular, os principais são a histamina e o óxido nítrico, sendo seguido de rápido aumento na permeabilidade da microcirculação, com extravasamento de fluido rico em proteínas para o tecido extravascular. A perda de líquido para o interstício resulta em estase devido a concentração de hemácias nos vasos de menor calibre e aumento da viscosidade sanguínea. A estase facilita o acúmulo, adesão e migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, no interstício⁴.

A perda de proteínas do plasma reduz a pressão osmótica intravascular e aumenta a pressão osmótica no fluido intersticial, que associado ao aumento da pressão hidrostática decorrente de maior fluxo sanguíneo local, culminam em extravasamento e acúmulo de fluido no interstício, causando edema.

O aumento da permeabilidade vascular devido às alterações endoteliais ocorre em fases distintas. A resposta imediata transitória dura cerca de 30 minutos e é mediada pela histamina e leucotrienos. Esta é sucedida pela resposta tardia que começa cerca de 2 horas depois e tem duração aproximada de 8 horas, mediada principalmente por cininas e produtos do complemento⁴.

O deslocamento de leucócitos à lesão e sua posterior ativação é função crítica da inflamação. A sequência de eventos leucocitários segue etapas, sendo elas a marginação, o rolamento e a adesão ao endotélio, seguidas de transmigração ou diapedese e, por fim, migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático^{6, 7}.

Quando ocorre ativação celular pelo estímulo inflamatório, há remodelação lipídica na membrana das células para gerar mediadores que funcionam como sinais intracelulares ou extracelulares, esses mediadores lipídicos conhecidos como autacóides (hormônios de curto alcance) são formados rapidamente, se degradam espontaneamente ou são destruídos por via enzimática⁸.

O ácido araquidônico é encontrado na forma esterificada nos fosfolípidos da membrana, sendo liberado por meio da ação das fosfolipases celulares. Os metabólitos do ácido araquidônico conhecidos como eicosanóides são sintetizados por duas classes principais de enzimas, as ciclooxigenases (prostaglandinas e tromboxanos) e as lipoxigenases (leucotrienos e lipoxinas)⁹.

Sendo o sistema de defesa do hospedeiro tão potente, é necessário controle estrito para minimizar o dano tecidual. Com a progressão da resposta inflamatória, existem gatilhos celulares que resultam em mudança no padrão de secreção de quimiocinas, por exemplo a secreção de lipoxinas (LXA₄), que inibem o recrutamento de polimorfonucleares e a liberação de TGF- β e IL-10 (citocinas anti-inflamatórias)¹⁰.

Tanto a inflamação quanto o reparo tecidual podem ser potencialmente prejudiciais. Por essa razão existem mecanismos celulares e agentes exógenos capazes de regular o processo inflamatório¹¹.

Os anti-inflamatórios, classe de fármacos que atua modulando a cascata inflamatória, são classificados, de acordo com seu mecanismo de ação, em duas categorias: os esteroidais, ou análogos do cortisol, que atuam sobre os leucotrienos, e os não esteroidais atuando sobre as ciclooxigenases^{12, 13}.

As ações terapêuticas e farmacológicas dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são atribuídas, principalmente, à sua habilidade em inibir a ciclooxigenase (COX), enzima responsável por catalisar a conversão do ácido araquidônico à prostaglandinas (PGs) e tromboxane A₂ (TXA₂)^{12, 14}.

Oficialmente conhecida como prostaglandina-endoperóxido sintase (PTGS), a COX pertence a uma família de isoenzimas que é responsável pela formação de prostanoídes, incluindo tromboxano e prostaglandinas, como a prostaciclina.

O termo "COX" é encontrado com mais frequência do que "PTGS", porém em genética, "PTGS" é oficialmente usado para esta família de genes e proteínas, pois a denominação "COX" pertence à família das enzimas citocromo C oxidase.

A diferença mais significativa entre as isoenzimas (COX 1 e 2), que permite a inibição seletiva, é a substituição da isoleucina na posição 523 da COX-1 por valina na COX-2. O menor tamanho da Val₅₂₃ na COX-2 permite o acesso a um sítio de ligação hidrofóbico na enzima. As moléculas de medicamentos, como os coxibes, com

capacidade de ligar-se a este sítio alternativo são consideradas inibidores seletivos de COX-2.

Existem, pelo menos, duas isoformas de COX bem caracterizadas, a COX-1 constitutivamente expressa e a COX-2, altamente induzida na resposta ao estímulo inflamatório¹⁵.

Embora esteja bem estabelecido que as isoformas contribuem para o desenvolvimento da inflamação e da dor nos tecidos periféricos¹⁶, os seus papéis funcionais são complexos e não muito claros. Diferente dos tecidos periféricos nos quais a COX-1 está presente para prover a homeostasia tecidual, a COX-2 é induzida pela inflamação¹⁴. Contudo no sistema nervoso central (SNC) as duas isoformas estão constitutivamente presentes com atuações funcionais diferentes^{17, 18}.

A COX-2 é, geralmente, expressa em níveis baixos, seu aumento tanto no SNC como no sistema nervoso periférico ocorre como reação à lesão tecidual ou à inflamação¹⁹. A lesão tecidual desencadeia tráfico aferente persistente de impulso que dá início à sensibilização central. As prostaglandinas possuem papel importante no aparecimento de sinais e sintomas da inflamação²⁰. Elas sensibilizam os terminais aferentes das fibras C e acentuam as respostas das fibras C ao estímulo algíco que resulta em hiperalgesia^{21, 22}.

A inflamação neurogênica descreve, um fenômeno de vasodilatação arteriolar originado pelas fibras nervosas locais, com aumento do fluxo sanguíneo e conseqüente edema por extravasamento de plasma da vênula pós-capilar. Quando bem localizado, o evento traduz-se na formação de uma pápula com eritema. Essa reação ocorre pela presença local de neuropeptídeos, que são liberados por duas subpopulações de fibras nervosas, assim chamadas peptidérgicas: as fibras do tipo C (aferentes não mielinizados ou nociceptores polimodais C) e, em menor quantidade, as fibras A-delta (pequenas fibras mielinizadas). Juntas, elas desempenham as funções autonômicas e de nocicepção e propiciam o início das reações imunes e pró-inflamatórias no sítio da lesão²⁰.

Os nociceptores interagem como o meio quando estão excitados, produzindo e liberando substâncias algogênicas (pró-inflamatórias) especiais, como as taquicininas A, B e a substância P, um polipeptídeo relacionado como o gene da calcitonina e a

somatostatina. Essas substâncias liberadas no interstício se difundem e agem à distância, reduzindo os limiares dos nociceptores. Agem também em células vizinhas, fazendo-as degranular e liberar substâncias pró-inflamatórias e algogênicas. A função secretora dos nociceptores é prova da ação inflamatória neurogênica ^{20, 21}.

Na ausência de lesão tecidual ou após seu reparo e cicatrização, o estado de alerta, de limiar diminuído à dor, e de inflamação, retorna, gradativamente, ao seu estado inicial. A cascata pode retornar a um estado de superalerta em condições nas quais o risco de lesão se torna elevado, como a detecção de novos estímulos nociceptivos intensos, repetidos e persistentes ²¹.

Tal sensibilização é expressão da plasticidade sináptica que ocorre no SNC deflagrada por estímulos nociceptivos persistentes. Na cronicidade pode haver um estado persistente de facilitação, potenciação, aumento ou amplificação da resposta nociceptiva. Pode ocorrer redução de influências inibitórias nos neurônios sensitivos do corno dorsal da substância cinzenta medular e alterações sinápticas e intracelulares que culminam na produção permanente de sinalização da presença de estímulos dolorosos, mesmo na ausência de verdadeira estimulação periférica.

As prostaglandinas ativam fibras aferentes sensitivas e promovem a nocicepção na medula espinhal pela despolarização dos neurônios do tipo WDR e bloqueiam a inibição neuronal feita pela glicina. As expressões da COX-2 e da PGE₂ aumentam drasticamente após lesão nervosa, tanto no local da lesão quanto na medula espinhal ²².

Os anti-inflamatórios não esteroidais, são utilizados como adjuvantes aos opióides, no tratamento da dor pós operatória, com o objetivo de diminuir as doses e os efeitos colaterais desses últimos. O parecoxibe, inibidor seletivo da COX-2, bloqueia a síntese de prostaglandinas, associadas à dor e inflamação, sem os efeitos colaterais de bloqueio da COX-1 e está envolvido com a modulação do estímulo nóxico e com ativação neuronal no córtex somatosensorial²³.

Os efeitos analgésico e anti-inflamatório dos AINES parecem estar relacionados à sua capacidade de inibir a COX e a síntese de PG, bloqueando assim, a sensibilidade excessiva à dor induzida pela ativação do glutamato e dos receptores de substância P. Como os AINES atuam por meio de sistema enzimático e não por ação em receptores, é pouco provável que ocorram efeitos colaterais como depressão respiratória, retenção

urinária e tolerância medicamentosa, comumente observados quando se administram opióides no espaço peridural²⁴.

Estudos sobre sensibilização central após a administração de fármacos no espaço subaracnoideo mostraram que a hiperalgisia resultava, em parte, da ativação de cascata complexa iniciada pela liberação de neurocinina-₁ (NK-₁) e ativação de receptores do N-metil-D-aspartato (NMDA) secundários a liberação de substância P e de glutamato. Essa cascata ativa as fosfolipases espinais e gera prostanóides pela ação de COX espinal²⁵ resultando em liberação desses prostanóides^{26, 27}.

Foi observado que os efeitos hiperalgésicos^{28, 29} e a liberação espinal de prostaglandinas³⁰ diminuíram após a administração de inibidores da COX pela via subaracnoidea em doses dos fármacos que não foram suficientes para desencadear efeitos sistêmicos, como dispepsia, hemorragia do trato gastrointestinal e lesão renal aguda. Tal fato veio demonstrar que os AINEs, de alguma forma, apresentam ação central.

Estes estudos enfatizaram que as prostaglandinas são liberadas no espaço extracelular extra-vascular de sítios espinais e supra-espinais secundária à atividade neuronal. A ativação repetitiva dos neurônios espinais ou a excitação dos receptores da substância P ou glutaminérgicos do corno dorsal evocariam estado de facilitação do processo de hiperalgisia e a liberação de PGs. A administração de prostanóides na medula espinal levaria a hiperalgisia¹⁸.

Embora muitos estudos tenham sido realizados indicando a eficácia dos antagonistas da COX em aliviar o processo da dor, quase nada foi estudado sobre a toxicidade desses fármacos administrados no neuroeixo.

O único estudo publicado na literatura do meu conhecimento é o de Kim et al.³¹ que pesquisaram os efeitos do parecoxibe administrado no espaço peridural de ratos. Não foi constatada toxicidade nervosa e não foram pesquisados os efeitos do fármaco sobre as meninges. Outros autores³², considerando que a COX-₂ aplicada no corno dorsal da medula modularia o processo nociceptivo^{33, 34} e a ausência de neurotoxicidade após injeção peridural em ratos³¹ adicionaram o antagonista da COX-₂ (parecoxibe) ao anestésico local (ropivacaína) constatando aumento na duração do bloqueio de nervo periférico em seres humanos, além do alívio da dor pós-operatória. Sugeriram que o

antagonista da COX-2 aplicado diretamente no nervo periférico ou central poderia ter efeitos analgésicos melhores do que quando ele era administrado pela via intravenosa.

Tal sugestão é um tanto quanto alarmante porque o fármaco não foi sintetizado para ser empregado por estas vias e, não existem pesquisas suficientes que atestem a ausência de toxicidade quando administrado no sistema nervoso central e periférico.

Todas as vezes que um novo agente analgésico é introduzido para utilização clínica, mesmo que seja considerado seguro para uso intravenoso, ele não é obrigatoriamente seguro quando administrado no espaço subaracnoideo ou peridural^{35, 36}. Para assegurar a ausência de toxicidade, este novo agente deve ser testado em grande número de animais, de diferentes espécies, antes que seja administrado no homem³⁷.

Diferentemente dos inibidores seletivos da COX-2 de primeira geração que apresentam pequena solubilidade aquosa o que restringe a opção de doses, o pró-fármaco designado parecoxibe sódico³⁸ inibidor da COX-2 de segunda geração é altamente solúvel em água e rapidamente convertido em valdecoxibe e ácido propiônico in vivo com meia-vida plasmática de aproximadamente 22 minutos, apresentando intensa atividade analgésica e anti-inflamatória³⁹. A eliminação do valdecoxibe é extensivamente por metabolização hepática envolvendo vias múltiplas, incluindo citocromo P-450 (CYP-isoenzimas 3A₄ e CYP₂C₉) e glicuronidação do radical sulfonamida (cerca de 20%).

Foi descrito que o parecoxibe possui atividade analgésica quando administrado pela via subaracnoidea de ratos⁴⁰ o que sugere que o pró-fármaco pode ser hidrolisado na medula espinal. É descrito que a atividade da enzima ciclooxigenase está presente nos neurônios e nas células gliais da medula espinal de diversas espécies de mamíferos^{41, 42}. Em modelo experimental de ratos com osteoartrite, a injeção intra-articular de parecoxibe foi eficaz em promover analgesia, mostrando que o fígado não é o único local onde ocorre a hidrólise enzimática do parecoxibe para o valdecoxibe⁴³.

2 HIPÓTESE

Apesar de o parecoxibe administrado pela via subaracnoidea apresentar efeitos analgésico e anti-inflamatório, o fármaco determina lesão histológica no tecido nervoso medular e/ou nas meninges.

3 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos que diferentes doses de parecoxibe, administradas pela via subaracnoidea, em punção única, determinariam sobre a medula espinal e as meninges de coelhos.

4 MÉTODO

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados 30 coelhos adultos jovens, fêmeas, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 2.510 gramas e 3.560 gramas e comprimento de medula entre 38 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 três grupos experimentais.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos por lista gerada por computador e envelopes selados em três grupos experimentais, com 10 animais em cada grupo, submetidos, inicialmente, à anestesia venosa com xilazina e cetamina e, em seguida, à punção subaracnoidea. Os grupos se diferenciaram pela dose de parecoxibe injetada ou seja:

Grupo S – solução salina a 0.9%

Grupo P₄ – parecoxibe (4mg)

Grupo P₈ – parecoxibe (8 mg)

4.3 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Em todos os animais foi realizada a seqüência 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 na mesa;
- Medida do comprimento da medula espinal;
- Limpeza local com água e sabão;
- Tricotomia;
- Limpeza do local com solução salina salina a 0,9 % 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 após recuperação da anestesia;
- Manutenção em cativeiro durante 21 dias sob observação clínica;
- Sacrifício do animal;
- Remoção da medula espinhal 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^{-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 e para obtenção do comprimento da medula espinhal foi medida a distância base do crânio ao espaço lombossacral;
- Foi realizada a limpeza da pele e pelos 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 salina a 0,9% e, após a antissepsia com solução tópica de gluconato de clorexidina a 2% , foram colocados os campos estéreis.

4.5 ANESTESIA SUBARACNOIDEA

4.5.1 Técnica de punção

Em modelo experimental de estudo dos efeitos tóxicos de droga administrada no espaço subaracnoideo não pode haver trauma de tecido nervoso desencadeado pela punção. Assim sendo o espaço intervertebral a ser abordado deve ser o mais caudal que permita a passagem da agulha, naquela espécie animal. No coelho este espaço encontra-se entre as vértebras S₁ e S₂. Para a identificação deste espaço intervertebral e a determinação do local da punção subaracnoidea, palpam-se as duas tuberosidades do osso íliaco e o processo espinhoso da primeira vértebra sacral deslizando-se o dedo 1.5 cm a 2 cm em direção caudal. O espaço S₁-S₂ localiza-se 1 cm caudal ao processo espinhoso da primeira vértebra sacral.

O bloqueio subaracnóideo foi guiado com auxílio da ultrassonografia, por veterinária radiologista, 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.

Todas as punções subaracnoideas foram realizadas pelo mesmo pesquisador envolvido no estudo, com agulha de *Quincke* de calibre 25 G 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 e, então guiada por ultrassom, até penetrar o espaço subaracnoideo.

Após a identificação do espaço, os animais dos grupos S, P₄ e P₈ receberam as soluções correspondentes. Foram registradas as dificuldades na realização da punção subaracnoidea.

4.6 VOLUME INJETADO

Foram administrados 10 µl por centímetro de medula espinhal (0,4 ml), injetados em 1 segundo, em seringa de 1 ml, descartável. Os animais do grupo S receberam 0,4ml de solução salina a 0,9% estéril. Os animais de P₄ receberam 0,2 ml de parecoxibe (40mg diluído em 2 ml de solução salina a 0,9 % - 20 mg.ml⁻¹) e 0,2 ml de solução salina a 0,9%, totalizando 0,4ml de solução, injetados em 1 segundo. Os coelhos pertencentes ao P₈ receberam 0,4 ml da solução de parecoxibe (20 mg.ml⁻¹), seguindo o protocolo utilizado nos grupos anteriores.

4.7 SOLUÇÃO ADMINISTRADA

Solução salina a 0,9% (P) e parecoxibe sódico 40 mg (Bextra[®], Pfizer, New York, USA) nos grupos P₄ e P₈.

4.8 OBSERVAÇÃO CLÍNICA

Após a punção subaracnoidea ou a injeção da solução sorteada, os animais foram retirados da mesa e, quando recuperados da anestesia venosa, foram avaliados clinicamente quanto à motricidade e à sensibilidade dolorosa. A motricidade foi avaliada pela observação clínica, com base nos critérios estabelecidos por Drummond; Moore (1989)⁴⁴; Selander et al. (1979)⁴⁵:

Critério de motricidade, baseado em Drummond; Moore (1989)⁴⁴

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 da região dos dermatomos sacrais, lombares, torácicos e da orelha com auxílio de pinça dente de rato, foram avaliados os seguintes sinais indicativos de dor: retração da pata, mudança de postura e gemência após a aplicação dos estímulos dolorosos descritos acima.

Os animais permaneceram em cativeiro durante 21 dias, sob observação clínica. Foram verificadas as alterações motoras com base no critério dos autores^{44, 45} acima.

4.9 SACRIFÍCIO

O sacrifício foi realizado por decapitação, após anestesia prévia com xilazina e cetamina pela via intravenosa. A porção lombar e sacral da medula espinhal e as raízes da cauda equina foram retiradas em tempo inferior a 3 minutos, para minimizar os riscos de lesão tecidual desencadeada por isquemia e apoptose. O tecido medular e as raízes foram fixados em solução de formalina a 10% para posterior exame histológico.

4.10 EXAME HISTOLÓGICO

As peças anatômicas permaneceram, durante sete dias, em solução de formalina. Os cortes transversais do tecido nervoso e das meninges iniciaram-se, aproximadamente, cinco 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 do tecido medular foram colocados em blocos de parafina e corados pelo método de hematoxilina-eosina.

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

Critérios para análise dos cortes do tecido nervoso e das meninges⁵⁷

<i>Tipo de lesão</i>	1	Aracnoidite
	2	Aracnoidite + lesão nervosa
	3	Lesão nervosa
<i>Localização da lesão</i>	1	Região posterior (P)
	2	Região lateral (L)
	3	Região anterior (A)
	4	P + L
	5	L + A
	6	P + L + A
<i>Extensão da lesão</i>	1	< 10%
	2	10 – 50%
	3	> 50%
<i>Profundidade da lesão</i>	1	Substância branca
	2	Substância cinzenta
	3	Substâncias branca e cinzenta
<i>Vaso sanguíneo</i>	1	Normal
	2	Espessamento fibroso
	3	Trombose

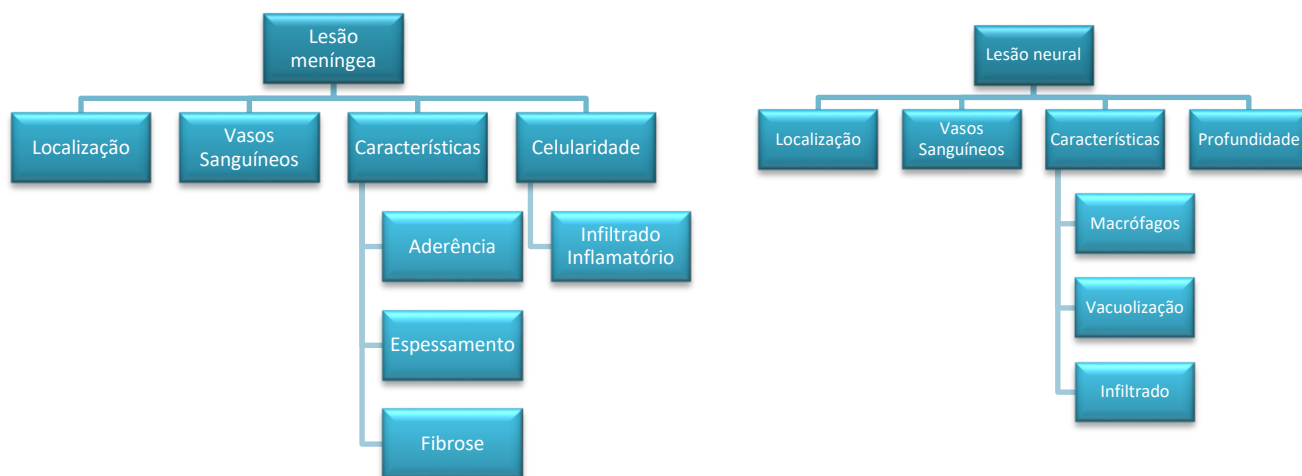
Crêterios para análise dos cortes do tecido nervoso e das meninges, na presença de aracnoidite adesiva: ⁵⁷

<i>Aderência</i>	0	Ausente
	1	Dura máter (D) + Aracnoide (A)
	2	A + Pia Máter (P)
	3	D + A + P
<i>Espessamento de meninge</i>	0	Ausente
	1	Leve
	2	Moderado
	3	Intenso
<i>Infiltrado linfoplasmocitário</i>	0	Ausente
	1	Leve
	2	Moderado
	3	Intenso
<i>Fibrose</i>	0	Ausente
	1	Leve
	2	Moderada
	3	Intensa

Crêterios para análise dos cortes do tecido nervoso e das meninges, na presença de lesão de nervo: ⁵⁷

1	Vacuoliza�o
2	Infiltrado linfoplasmocitário
3	Macrófagos

Quadro 1 – organograma da avaliação histológica



4.11 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL (CEUA)

A presente pesquisa foi submetida à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu em 04/04/2013 (CEUA 1011/2013), e esta de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

4.12 MODELO DE ESTUDO

Este estudo experimental foi controlado e randomizado. A análise histológica dos resultados foi encoberta, realizada por 3 pesquisadores envolvidos no estudo (EMG, FMLVS, MEAM).

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

4.13 MÉTODO ESTATÍSTICO

4.13.1 Tamanho amostral

Pressupondo-se uma estimativa de taxa de lesão do tecido nervoso de 70%⁵⁴ e de taxa induzida de 1% para a solução salina a 0,9%, 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.

Tendo como objetivo avaliar a homogeneidade dos grupos com relação ao peso e ao comprimento de medula, foi realizado, como método estatístico, a Anova, resultados expressos em média e desvio padrão, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

A análise estatística dos valores mostrou homogeneidade entre os grupos com relação ao peso ($p = 0,18$) e ao comprimento de medula vertebral ($p = 0,37$) (tabela 1).

Dois animais foram excluídos do experimento por dificuldades na realização da técnica de punção. Um coelho do P₄ por dificuldade na visibilização do espaço subaracnoideo durante a abordagem com o ultrassom e um do P₈ por movimentação durante a injeção da solução sorteada. Todos os animais de P₄ e P₈ permaneceram sem alterações neurológicas após a recuperação da anestesia venosa e durante o período de cativeiro. Dois animais do P₈ desenvolveram paralisia das patas posteriores e sensibilidade dolorosa diminuída na mesma região desde a recuperação da anestesia venosa que se manteve durante os 21 dias de cativeiro até o sacrifício. Um deles apresentou relaxamento do esfíncter anal com perda espontânea de fezes. Ambos apresentaram foco de necrose no tecido nervoso e áreas de aderências entre a pia-máter e aracnoide (animais n^o 1 e 2, figuras 4, 5, 6 e 7 e tabela 3).

Nenhum coelho do G₁ apresentou alterações histológicas no tecido nervoso, vasos sangüíneos e meninges (figura 1). Cinco coelhos do P₄ (tabela 2, figuras 2 e 3) e seis do P₈ (tabela 3, figuras 4, 5, 6 e 7) apresentaram alterações histológicas dos tecidos do neuroeixo.

Tabela 1: Peso (g) e comprimento de medula (cm) dos animais pertencentes aos três grupos experimentais. Resultados expressos em média e desvio padrão com $p < 0,05$.

	S	P ₄	P ₈
Peso (g)	2975 ± 279	2855 ± 351	3130 ± 336
Comprimento de medula (cm)	39,4 ± 0,7	39,6 ± 0,7	39,2 ± 0,4

Tabela 2: Resultados histológicos dos animais pertencentes ao P₄

Animal	Resultados histológicos
Nº 1	TN – normal. Meninges - normais. VS – normais
Nº 2	TN – normal. Meninges – focos de infiltrado inflamatório perivascular na aracnoide, região posterior (<5%) VS – normais.
Nº 3	TN – normal. Meninges – normais. VS – Normais
Nº 5	TN – necrose das substâncias branca e cinzenta, na região central (30%) Meninges – infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular e difuso na pia-máter e aracnoide (50%). VS – espessamento hialino e trombose.
Nº 6	TN - normal Meninges – focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na região anterior e posterior da aracnoide e difuso na aracnoide e pia-máter (50%). VS – trombose
Nº 7	TN – normal. Meninges – normais. VS normais
Nº 8	TN - normal. Meninges – normais. VS – normais
Nº 9	TN normal Meninges – Focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário difusos na aracnoide (10 %). VS – normais
Nº 10	TN – normal Meninges – focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na aracnoide (<5%) VS – normais.

TN – tecido nervoso, VS – vasos sanguíneos

Tabela 3: Resultados histológicos dos animais pertencentes ao P₈

Animal	Resultados histológicos
Nº 1	TN – necrose na região póstero-lateral (5%) Meninges – infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular e difuso na aracnoide e pia-máter com áreas de aderências. VS - normais
Nº 2	TN – : focos de necrose em região anterior e antero-lateral (30%) Meninges – Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na aracnoide. Aderências entre a pia-mater e aracnoide nas regiões posterior, póstero-lateral, lateral, antero-lateral e anterior (30%). VS – normais
Nº 3	TN – normal Meninges – infiltrado inflamatório linfoplasmocitario perivascular e difuso na pia-máter e aracnoide (20%). VS – normais
Nº 4	TN – normal Meninges - focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na aracnoide (5%). Focos de infiltrado inflamatório perivascular no espaço de Virshow-Robin VS – normais
Nº 5	TN – normal. Meninges – normais. VS normais
Nº 6	TN – normal. Meninges – normais. VS normais
Nº 7	TN – normal Meninges – focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na aracnoide, regiões posterior e anterior (5%) VS – normais
Nº 9	TN – normal. Meninges – normais. VS - normais
Nº 10	TN – normal. Meninges – focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na aracnoide, região posterior (5%). VS – normais

TN – tecido nervos, VS vasos sanguíneos.

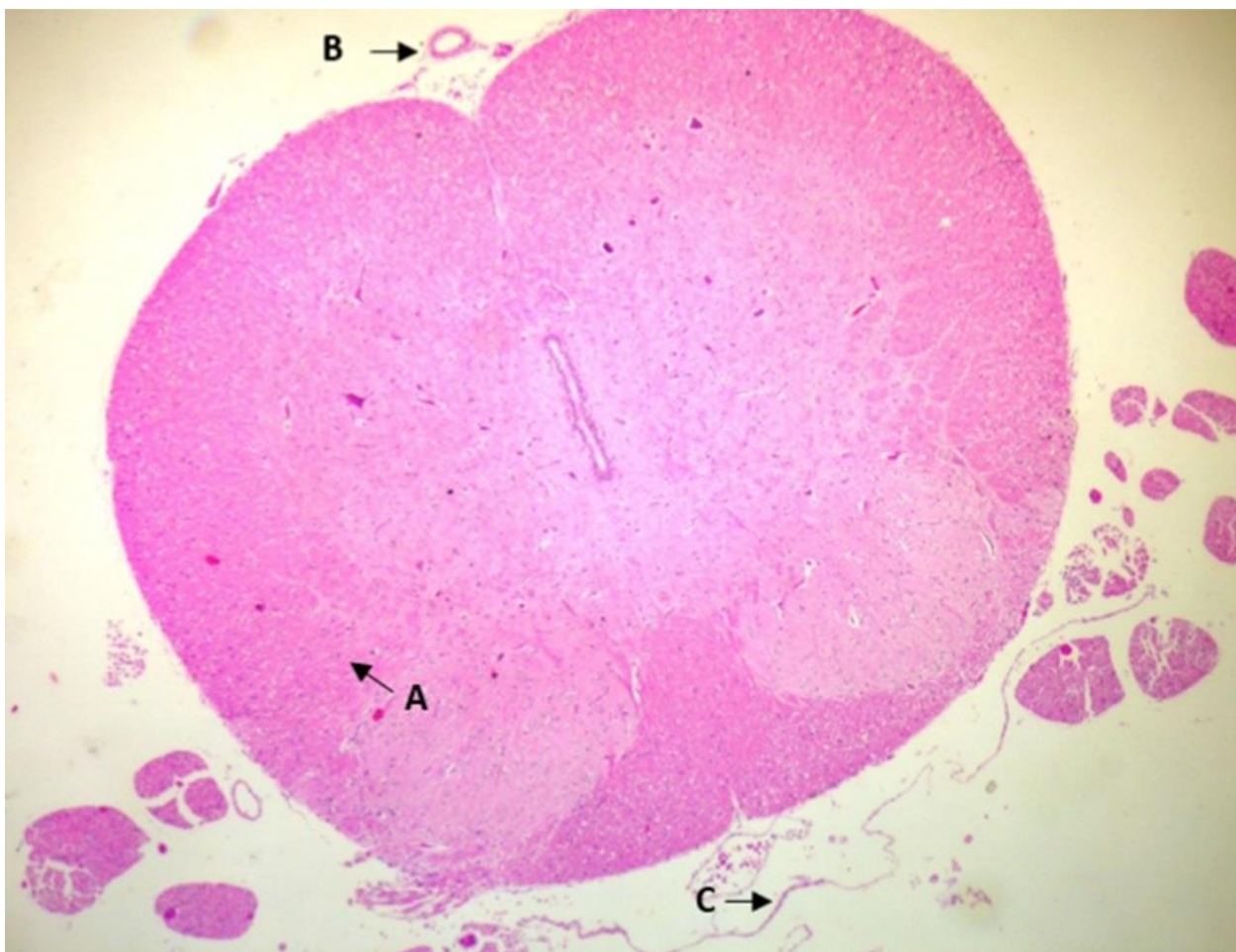


Figura 1: Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges normais (C) de animal nº 9 pertencente ao grupo S. HE 40x

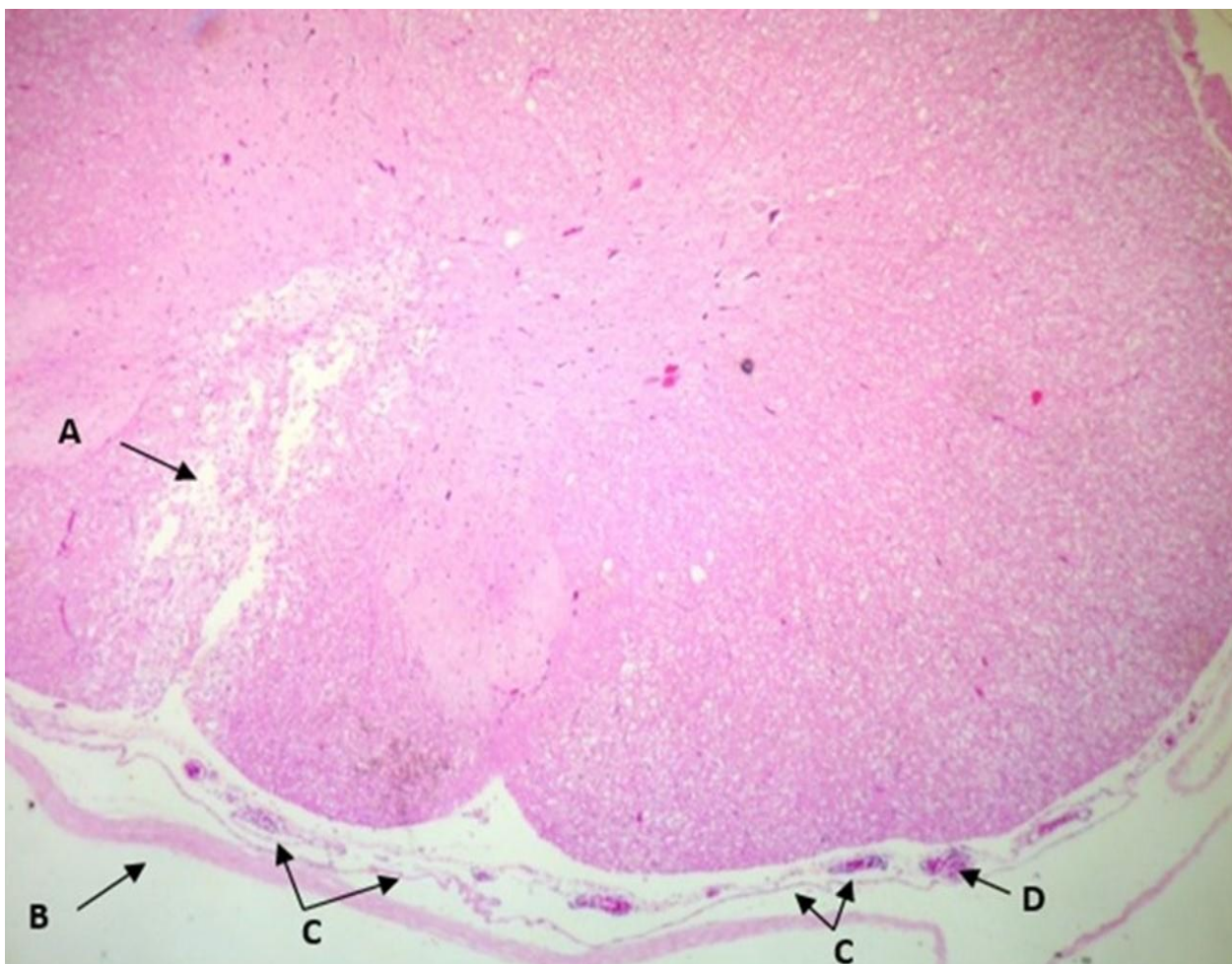


Figura 2: Necrose na região central das substâncias branca e cinzenta (A), dura-máter normal (B), Infiltrado inflamatório perivascular e difuso na aracnoide e pia-máter(C), trombose em vaso aracnoideo (D) de animal nº 5 pertencente ao P₄. HE 40x

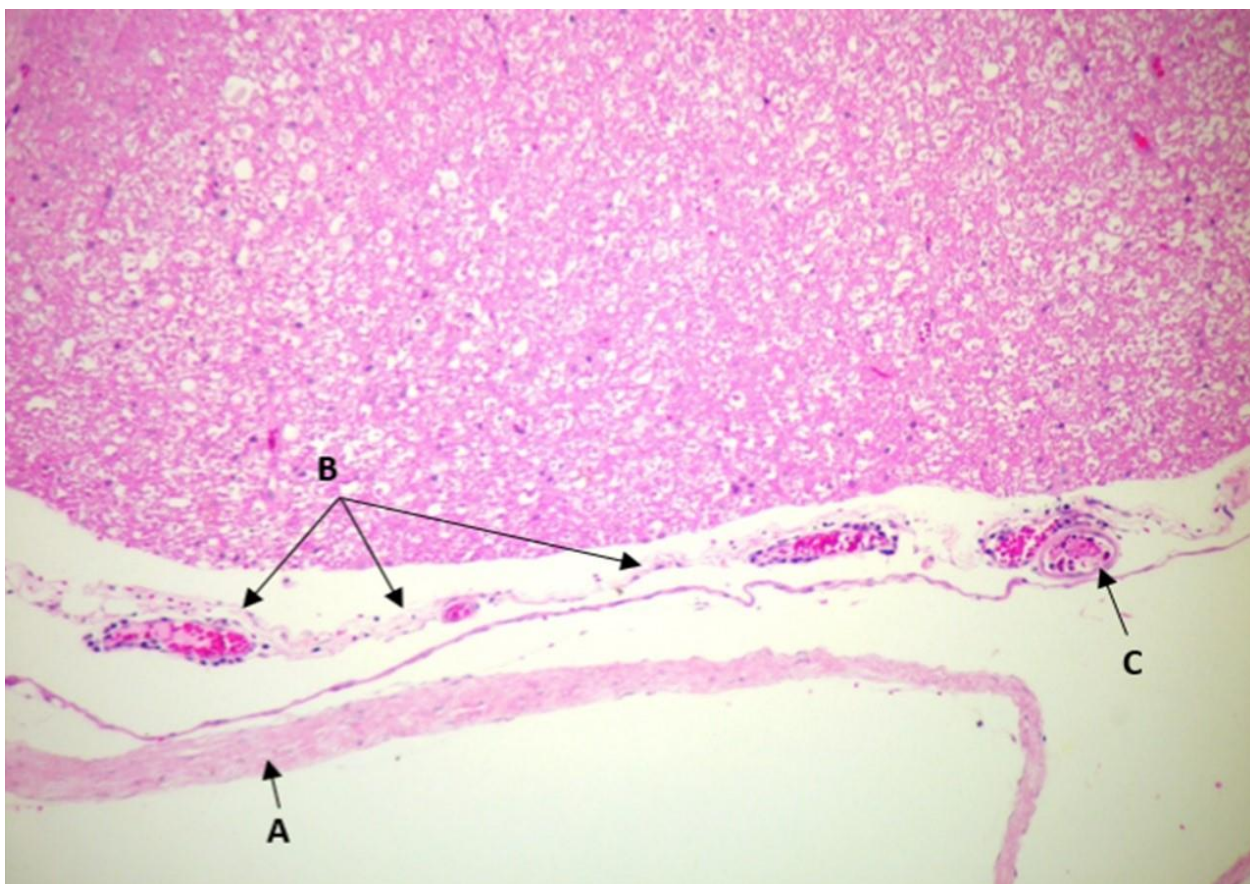


Figura 3: Dura-máter normal (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular e difuso na aracnoide e pia-máter (B), trombose em vaso aracnoideo (C) de animal nº 5 pertencente ao P₄. HE 100x

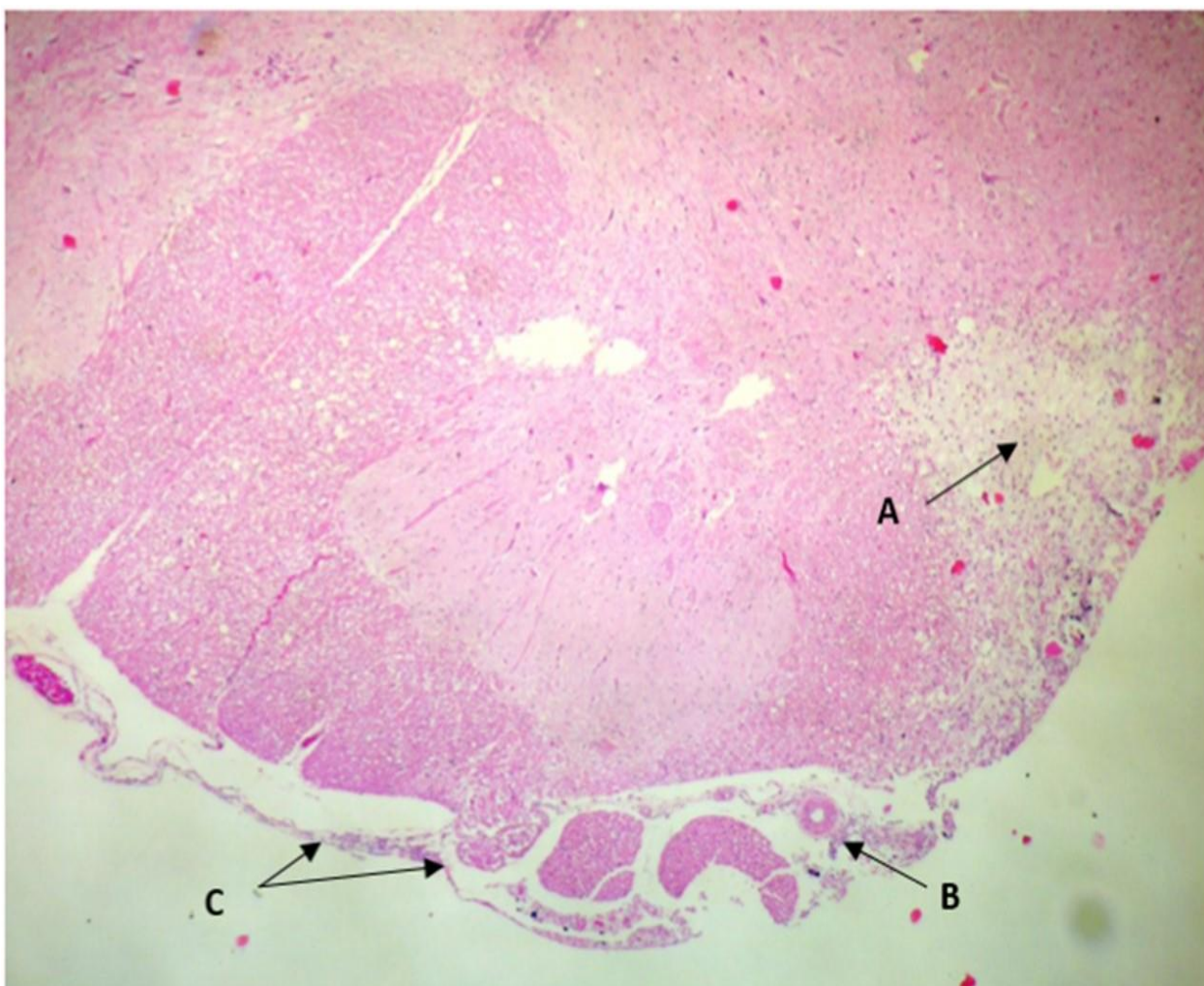


Figura 4: Necrose de tecido nervoso em região póstero-lateral (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular e difuso pelas meninges (B), aderências entre a pia-máter e aracnoide (C) de animal nº 1 pertencente ao P₈. HE 40x

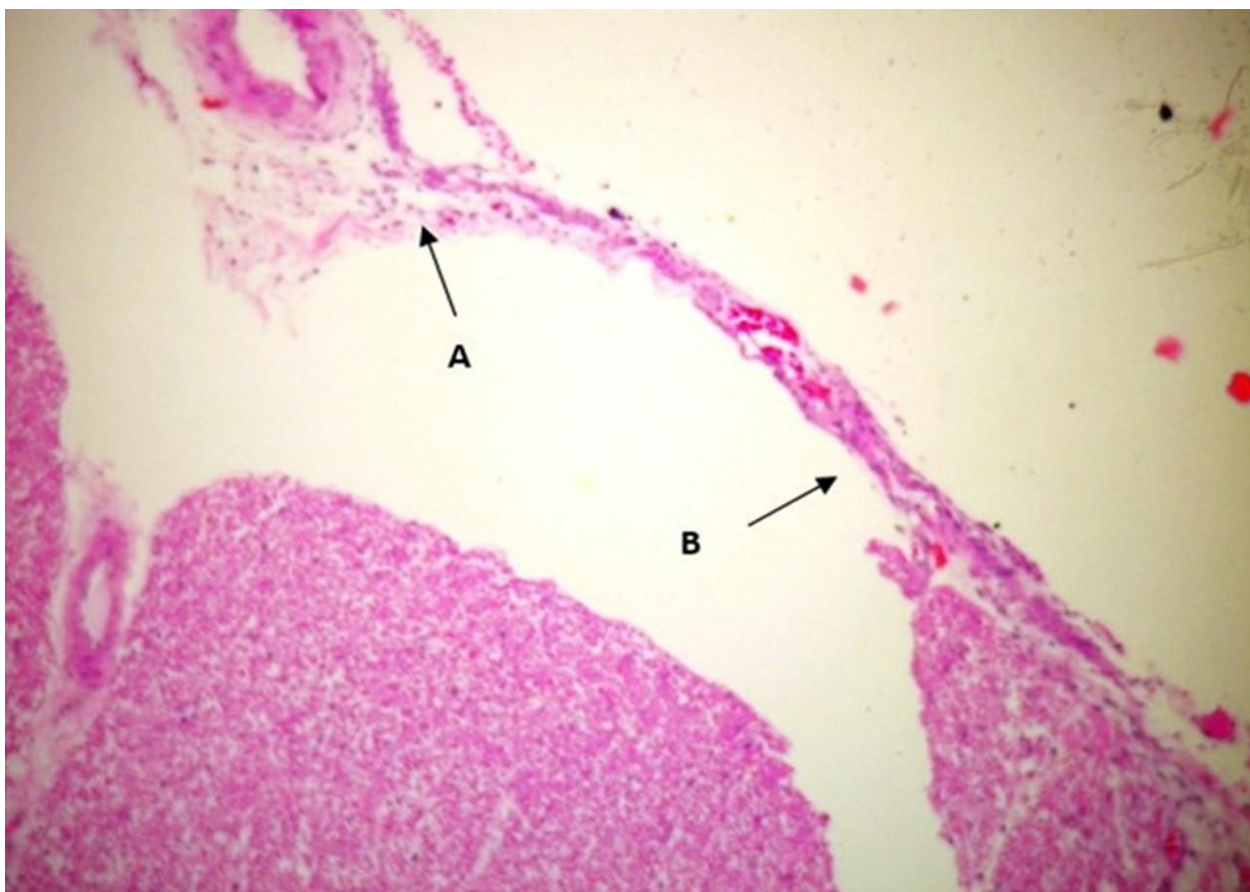


Figura 5: Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular (A) e adesão entre a aracnoide e pia-máter (B) de animal nº 1 pertencente ao P₈. HE 100x

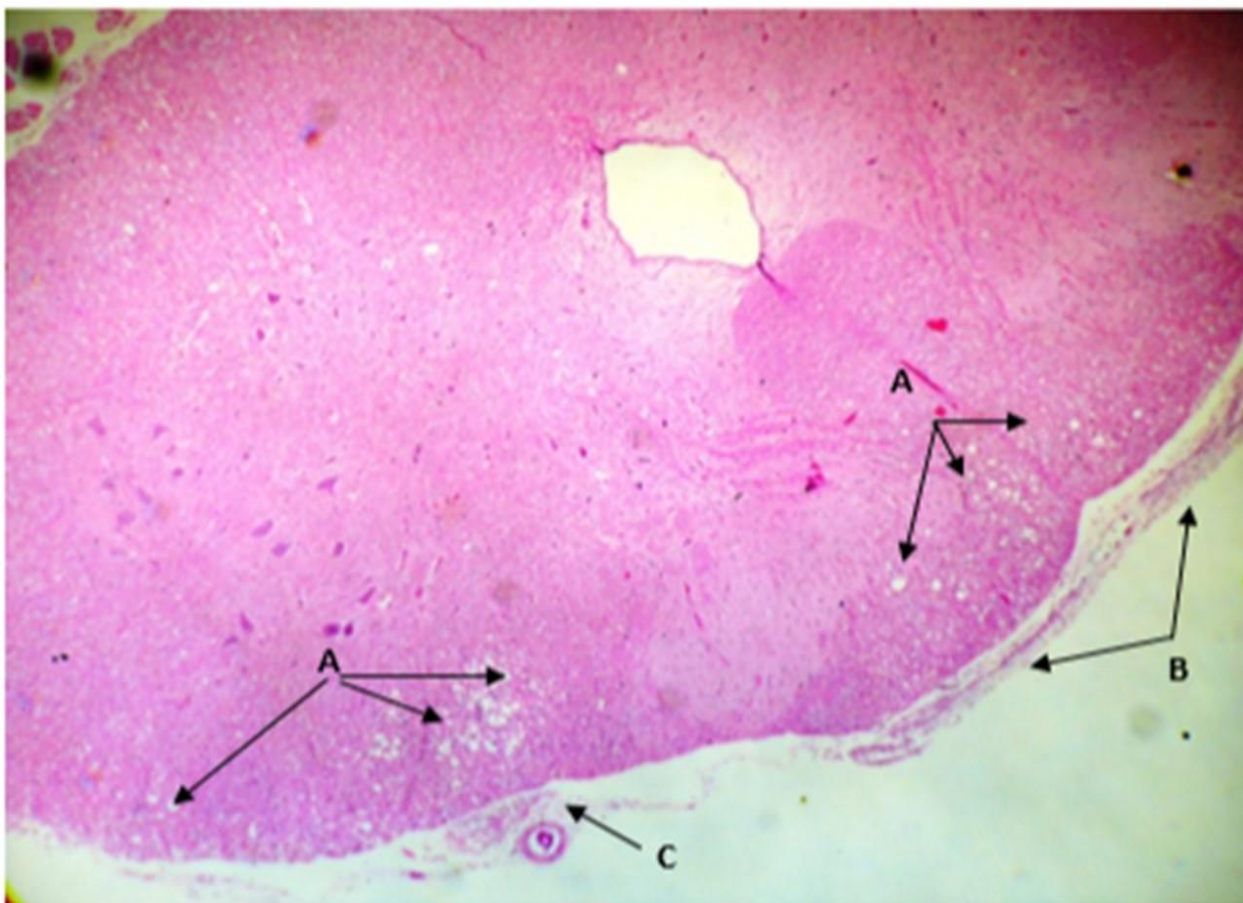


Figura 6: Tecido nervoso: focos de necrose em região anterior e antero-lateral (A), aderências entre a pia-máter e aracnoide (B), infiltrado inflamatório perivascular em meninges (C) de animal nº 2 pertencente ao P₈. HE 40x

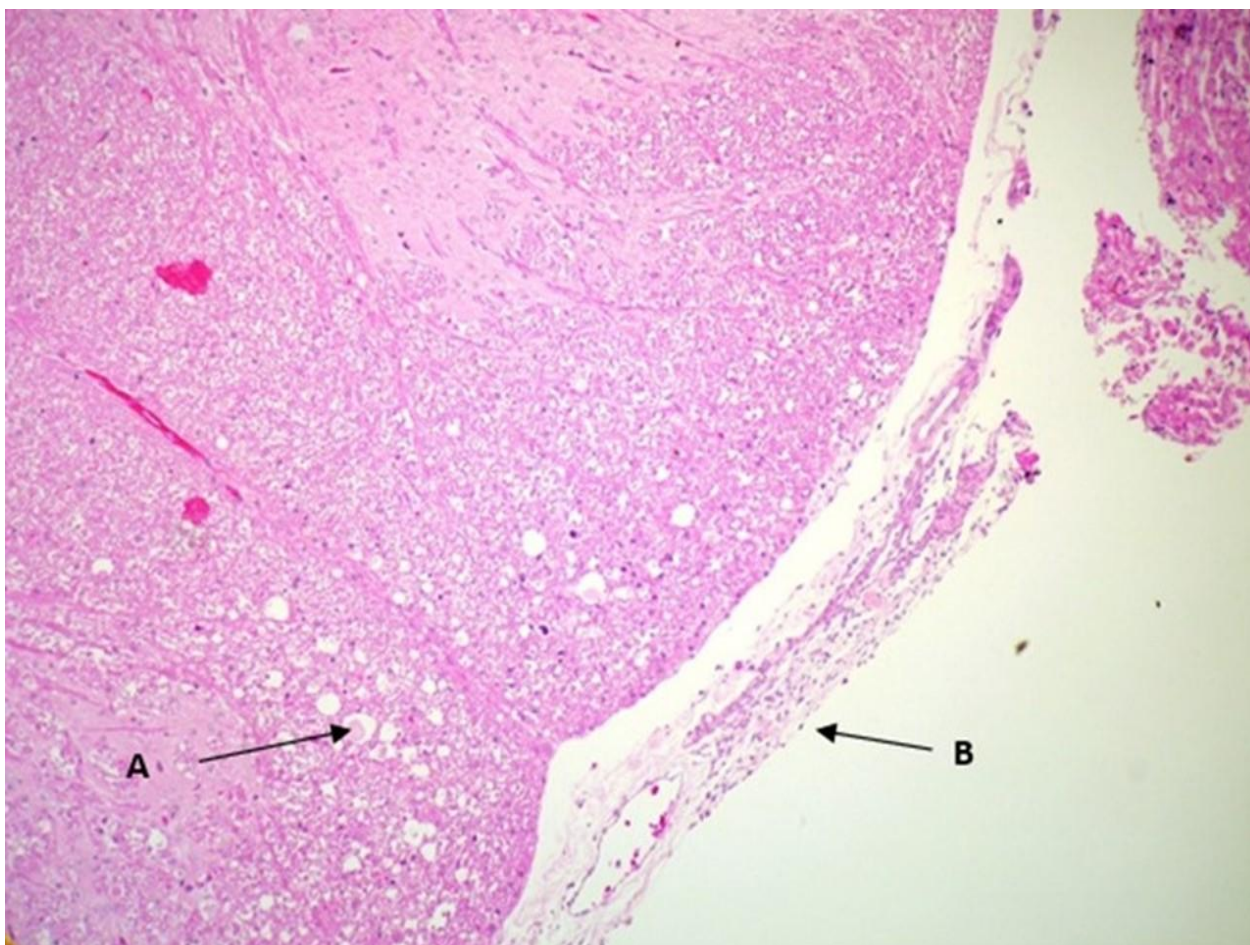


Figura 7: Foco de necrose de tecido nervoso (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e aderências entre a pia-máter e aracnoide (B) de animal nº 2 pertencente ao P₈. HE 100x

6 DISCUSSÃO

6.1 DISCUSSÃO DA METODOLOGIA

6.1.1 Ultrassonografia como guia de punção

Em modelos experimentais, visando estudar alterações que soluções introduzidas no espaço subaracnoideo determinam sobre o tecido nervoso e as meninges, é importante excluir a possibilidade da punção subaracnoidea ser o fator determinante de lesões consequentes ao trauma desencadeado pela agulha utilizada e à administração de soluções no interior da raiz nervosa.

Pesquisas realizadas em coelhos^{47, 48}, nos quais os fármacos foram administrados no espaço subaracnoideo com punção única, não mostraram, à microscopia óptica, alterações histológicas do tecido nervoso medular dos animais, nos quais foi administrado solução salina a 0,9% (doze coelhos). Em apenas um deles foi constatada laceração intensa da medula espinhal no local da punção⁴⁷, que foi realizada entre a última vértebra lombar e a primeira vértebra sacral.

Ready et al. (1986)⁴⁸ descreveram que, em coelhos, o espaço subaracnoideo pode ser abordado entre a primeira e a segunda vértebras sacrais, pela via paramediana, e que o volume do liquor é pequeno e não reflui através do canhão da agulha. Portanto, para diminuir a manipulação da agulha e, conseqüentemente, a possibilidade de trauma do tecido nervoso desencadeado pela punção, o espaço subaracnoideo foi identificado com o 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 sacral⁴⁹.

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, pois, 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 da ultrassonografia em anestesia regional permite a melhor visibilidade tanto das estruturas a serem abordadas, quanto das estruturas adjacentes, possibilitando o posicionamento adequado da agulha, evitando lesão de nervo, injeção intravascular do anestésico local e observação da área de dispersão da solução injetada⁵⁰.

Na presente pesquisa, a utilização da ultrassonografia como guia, permitiu minimizar a possibilidade da técnica de punção do espaço subaracnoideo ser o fator que determinou possíveis alterações no tecido nervoso da medula e nas meninges.

6.1.2 Grupos experimentais

6.1.2.1 Justificativa para composição dos grupos experimentais

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

O espaço subaracnoideo do coelho, no local onde foi realizada a punção, é o mais caudal que permite a passagem da agulha, porém é estreito, visto que ainda contém o tecido medular⁴⁹, portanto, é imperativo que o volume da solução administrada não seja o fator desencadeador de lesões nervosas. Alguns autores aventaram a hipótese de que aumentos agudos no volume do líquido podem levar ao aumento na pressão líquórica, comprometer o fluxo sanguíneo medular e causar isquemia com o surgimento de lesões neurológicas⁵¹. Somando-se ao que já foi exposto, este grupo serviu, também, para excluir eventual injeção intra-fascicular 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^{45, 52}.

Os grupos P₄ e P₈ que receberam o parecoxibe, tiveram por objetivo avaliar os efeitos do fármaco sobre o tecido nervoso e as meninges. Estas doses foram selecionadas tomando como base estudos realizados em outra espécie animal e em

outros locais do neuroeixo, visto que, não é de meu conhecimento estudos sobre a toxicidade do parecoxibe administrado pela via subaracnoidea em coelhos ou outra espécie animal³¹.

6.1.2.2 Volume da solução administrada

Em estudos realizados anteriormente, baseado no estudo de Ready, Plumer, Haschke⁴⁸, foram administrados 5 µl por centímetro de coluna vertebral (aproximadamente 0,2 ml). Pudemos observar que a analgesia que seguiu à injeção do anestésico local ficou restrita a metâmeros lombares baixos. No presente estudo optou-se por aumentar o volume a ser administrado tanto para favorecer a dispersão cefálica do fármaco quanto para que fosse possível utilizar a diluição recomendada pelo fabricante deste AINE.

6.1.2.3 Dose da solução administrada

As doses foram selecionadas tomando como base as pesquisas de que Kim et. (2011)³¹ que introduziram, no espaço peridural de ratos, 6 mg de parecoxibe (20 mg.kg⁻¹). Como dose administrada pela via subaracnoidea deve ser 1/10 daquela recomendada para ser injetada no espaço peridural⁴⁰, então a dose subaracnoidea seria de 2 mg.kg⁻¹. O peso médio do coelho é de aproximadamente 4 kg, portanto 8 mg poderia se correlacionar com a dose peridural administrada no rato³¹. Na presente pesquisa ficaram selecionadas as dose de 4 mg e 8mg empiricamente porque foram doses próximas daquelas estudadas em outras espécies.

6.1.2.4 Tempo de observação clínica no cativeiro

O tempo de observação clínica prolongado (21 dias) teve por objetivo avaliar os efeitos crônicos que a injeção subaracnoidea de parecoxibe, sem conservantes, poderia desencadear sobre as meninges, posto que, resultados de pesquisas anteriores, realizadas em cães, mostraram que quando o fármaco lesa primariamente o tecido nervoso, as alterações clínicas e histológicas são detectadas logo após a administração do agente^{53, 54, 55}, porém, para detecção de possíveis lesões nas meninges, é imprescindível observação clínica por tempo mais longo para que a inflamação e a aderência entre as meninges ocorra^{56, 57, 58}.

6.2 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Este estudo desenvolvido para avaliar as possíveis alterações que o parecoxibe poderia desencadear sobre os tecidos contidos no neuroeixo, após a injeção única no espaço subaracnoideo, mostrou que ele foi tóxico ao tecido nervoso e as meninges de coelhos.

Dois animais, nos quais a histologia mostrou aderências entre a aracnoide e a pia-máter, apresentaram alterações neurológicas. Em modelo similar para estudo de neurotoxicidade, porém em cães, constatou-se que somente quando as lesões foram mais extensas houve manifestação clínica detectável ao exame neurológico proposto^{54, 55}, fato que não acontecia com alterações focais⁵⁶. Também em coelhos, outros autores demonstraram que nem sempre houve correlação entre as lesões histológicas e a perda funcional neurológica⁴⁸.

Na presente pesquisa foi observada presença de reação inflamatória perivascular e difusa nas meninges na maioria dos animais que foram tratados com o parecoxibe, mostrando significância estatística.

Reação inflamatória das meninges pode ser a manifestação inicial da aracnoidite adesiva, que na maioria dos casos é desencadeada por substâncias químicas, quando estas são introduzidas no espaço subaracnoideo ou próximo a ele, por trauma mecânico

e por infecção. A arterite é achado comum e não se definiu claramente se faz parte do quadro inicial ou aparece no final do quadro.

A aracnoidite é uma das complicações mais graves da anestesia do neuroeixo. Consiste de diminuição de força muscular e alteração de sensibilidade nos membros inferiores e no períneo, acompanhadas por alterações vesicais e intestinais. O quadro inicia-se lentamente, alguns dias ou semanas após a realização do bloqueio, podendo, nos casos mais graves, levar à paraplegia completa, e até à morte⁵⁹.

Devido à variedade de sintomas, o diagnóstico da aracnoidite é difícil e a correlação precisa dos achados anatomopatológicos com a sintomatologia, ainda não está bem definida.

A aracnoidite adesiva crônica é o resultado da resolução do processo inflamatório, com grande depósito de colágeno⁶⁰. Existe reação proliferativa das leptomeninges, com obliteração do espaço subaracnoideo^{59, 61} em decorrência da formação de trabéculas, levando à deformidade das raízes nervosas⁶² com constrição das mesmas e da medula espinhal⁵⁹. Por obstruir o fluxo normal de líquido, a pressão intracraniana pode se elevar, entretanto é o comprometimento do suprimento sanguíneo da medula espinhal e das raízes nervosas o principal responsável pelas alterações neurológicas encontradas⁶¹, sendo que a arterite vista na aracnoide inflamada pode ser causa ou consequência do processo inflamatório.

Os agentes químicos são potencialmente capazes de determinar aracnoidite adesiva dentre eles destacam-se:

Os contrastes oleosos e aquosos utilizados para realização de mielogramas. Os primeiros permanecem no sistema nervoso central como um filme fino ou como depósitos encapsulados, geralmente nas regiões lombar e sacral. Os corticosteróides administrados pela via peridural e subaracnoidea, em decorrência dos preservativos contidos em sua solução. Os conservantes e antioxidantes contidos nas soluções de anestésicos locais⁶³, os agentes quimioterápicos administrados pela via subaracnoidea, o trauma, a cirurgia de coluna e as infecções como a meningite.

No passado, a aracnoidite adesiva foi associada à substâncias com a finalidade de alterar a gravidade específica da solução, como álcool e acácia, a contaminação do material utilizado na anestesia com antissépticos e detergentes^{55, 64}.

Os nossos resultados são diferentes daquele publicado por Kim et al.³¹ que não encontraram lesões de neurônios em ratos que receberam parecoxibe pela via peridural e não pesquisaram alterações nas meninges³¹. A metodologia dos dois estudos é diferente. Kim et al¹⁹ administraram o parecoxibe pela via peridural em ratos, no nosso estudo, entretanto, o fármaco foi injetado no espaço subaracnoideo de coelhos. Já esta bem estabelecido que durante a realização da peridural há sempre o risco de injeção subaracnoidea acidental, que ocorre em 5% a 7% dos procedimentos, sendo consenso que estes acidentes são potencialmente perigosos⁶⁵. Como o espaço peridural e o subaracnoideo não são inteiramente separados, substâncias injetadas em um deles podem ter efeitos em ambos⁶⁰.

Dessa forma a sugestão que o parecoxibe administrado pela via subaracnoidea poderia ser opção de tratamento de pacientes com dor aguda³¹ ou em opção de fármaco administrado diretamente no sistema nervoso central ou em nervos periféricos³² deve ser proscrita, pois mais estudos são necessários para que se comprove a segurança ou não do seu uso.

Limitação do estudo – o espaço subaracnoideo do coelho tem menor quantidade de liquor do que o de cães o que favorece a menor diluição do fármaco no mesmo e o maior massa da solução em contato com o tecido nervoso e meninges o que poderia exacerbar os efeitos deletérios do mesmo.

Não foi possível avaliar o potencial analgésico do parecoxibe, pois o coelho não expressa dor satisfatoriamente frente à estímulos álgicos ou sensações desconfortáveis, portanto não é animal de escolha em estudos experimentais para mensuração de efeito analgésico.

7 CONCLUSÃO

Neste modelo experimental de coelhos, diferentes doses de parecoxibe, em injeção única, administradas pela via subaracnoidea, determinaram alterações histológicas sobre a medula espinal e as meninges.

REFERÊNCIAS

1. Extraído de Robbins and Cotran. Pathologic bases of disease. 7th ed. 1999 - Cohnheim J. Lectures in General Pathology (translated by AD McKee, from the second German edition, Vol 1). London: New Sydenham Society; 1889.
2. Extraído de Robbins and Cotran. Pathologic bases of disease. 7th ed, 1999 - Hunter J. A treatise of the blood, inflammation, and gunshot wounds, Vol I. London: J. Nicoli. 1794.
3. Weissman G. Inflammation: historical perspectives. In Gallin JI, et al (Eds): Inflammation basic principles and clinical correlates. New York: Raven Press. 1992:5.
4. Majno G, Palade GE, Schoefl GI. Studies on inflammation II. The site of action of histamine and serotonin along the vascular tree: a topographic study. J Biophys Biochem Cytol. 1961;11:607.
5. Lentsch AB, Ward PA. Regulation of inflammatory vascular damage. J Pathol. 2000; 190:343.
6. Lampugnani MG, Dejana E. Interendothelial Junctions: structure, signalling and functional roles. Curr Opin Cell Biol. 1997;9:674.
7. Van Hinsbergh VW, Van Nieuw AGP. Intracellular signaling involved in modulating human endothelial barrier function. J Anat. 2002;200:549.
8. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science. 2001;294:1871.
9. Murakami M, Kudo I. Cellular arachidonate-releasing functions of various phospholipase A₂S. Adv Exp Med Biol. 2003; 525:87.
10. Tracey KJ. The inflammatory reflex. Nature. 2002; 420:853.
11. Nathan CF. Points of control in inflammation. Nature. 2002; 420:846.
12. Lloyd R, Derry S, Moore RA, McQuay HJ. Intravenous and intramuscular parecoxib for acute postoperative pain in adults. Cochrane Database Syst Rev. 2009; p.CD004771.
13. Abbas AK, Kumar V, Fausto N. Patologia: bases patológicas das doenças. 7^a ed. Elsevier; Rio de Janeiro, 2005.
14. Rouzer CA, Marnett LJ. Structural and functional differences between cyclooxygenases: fatty acid oxygenases with a critical role in cell signaling. Biochem Biophys Res Commun. 2005;33(8):34-44.

15. Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E. et al. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys.* 1993;307:361-8.
16. Martínez RV, Reval MD, Campos MD, Terrón R, Dominguez R, López-Munhòz FJ. Involvement of peripheral cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in inflammatory pain. *J Pharmacol.* 2002;54:405-12.
17. Pham-Marcou TA, Beloeil H, Sum X, Gentilli M, Yaici D, Benoit G et al. Antinociceptive effects of resveratrol in carrageenan-evoked hyperalgesia in rats: prolonged effects related to COX-2 expression impairment. *Pain.* 2008;140:274-283.
18. Yaksh TL. Course of Basic lectures in the biology of pain processing. Department of Anesthesiology. University of California San Diego. Jul. 2012:64.
19. Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL. Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285:1031
20. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol.* 1971;23(1):232-5.
21. Martin HA, Basbaum AI, Kwait GC, Goetzl EJ, Levine JD. Leukotriene and prostaglandin sensitization of cutaneous high threshold C and A-delta mechanoreceptors in the hair skin of rat hind limbs. *Neuroscience.* 1987;2:651-9.
22. Cohen MM, Perl ER. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. *J Neurophysiol.* 1990;64:457-64.
23. Peng YZ, Li XX, Wang YW. Effects of parecoxib and fentanyl on nociception-induced cortical activity. *Mol Pain.* 2010;6:3
24. Paavola A, Bernards CM, Rosenberg PH. Controlled release ibuprofen-poloxamer gel for epidural use - A pharmacokinetic study using microdialysis in pigs. *Eur J Pharm Biopharm.* Nov. 2016;9:1(8):180-186.
25. Yaksh TL, Hua XY, Kalcheva I, Nozaki-Taguchi N, Marsala M. The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:7680-6.
26. Yang LC, Marsala M, Yaks TL. Characterization of time course of spinal amino acids, citrulline and PGE2 release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic micro-dialysis study. *Pain.* 1996;67:345-54.

27. Ebersberg A, Grubb DB, Willingale HL, Gardiner NJ, Nebe J, Schaible HG. The intraspinal release of prostaglandin E2 in model of acute arthritis in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;285:775-81.
28. Malmberg AB, Yaksh TL. Antinociceptive actions of spinal non-steroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992;263:136-46.
29. Malmberg AB, Yaksh TL. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substantia P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science.* 1992;9:257-1276.
30. Malmberg AB, Yaksh TL. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. *Br J Pharmacol.* 1995;114:1069-75.
31. Kim YH, Lee PB, Park J, Lim YJ, Kim YC, Lee SC et al. The neurological safety of epidural parecoxib in rats. *Neurotoxicol.* 2011;32:864-870.
32. Liu X, Zhao X, Lou J, Wang Y, Shen X. Parecoxib added to ropivacaine prolongs duration of axillary brachial plexus blockade and relieves postoperative pain. *Clin Orthop Res.* 2013;471:562-8.
33. Koppert W, Wehrfritz A, Körber N, Still R, Albrecht S, Schüttler J et al. The cyclooxygenase-2 isozyme inhibitors parecoxib and paracetamol reduce central hyperalgesia in humans. *Pain.* 2004;108:148-53.
34. Martin F, Fletcher D, Chauvin M, Bouhassira D. Constitutive cyclooxygenase-2 is involved in central nociceptive process in humans. *Anesthesiology.* 2007;106:1013-8.
35. Rawal N, Nuutinen L, Raj PP, Lovering SL, Gobuty AH, Hargardine J et al. Behavioral and histopathologic effects following intrathecal administration of butorphanol, sufentanil, and nalbuphine in sheep. *Anesthesiology.* 1991;75:1025-34.
36. Gage JC, Eisenach JC. New intra-axial agents and their safety issues. In: Hine R, Bowdle A (Ed.). *Annual of anesthetics pharmacology.* Philadelphia: Saunders. 1997:65-102.
37. Yaksh TL, Collins JG. Studies in animals should precede human use of spinally administered drugs. *Anesthesiology.* 1989;70:4-6.
38. Talley JJ, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ, Koboldt CM, Masferrer JL et al. 4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]-benzene sulfonamide, Valdecoxib; a potent and selective inhibitor of COX-2. *J Med Chem.* 2000;43:775-7.
39. Talley JJ, Bertenshaw SR, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ et al. N-[(5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)-phenyl]sulfonylpropanamide, sodium salt, Parecoxibe sodium: a potent and selective inhibitor of COX-2 for parenteral administration. *J Med Chem.* 2000;43:1161-3.

40. Miranda HF, Pinardi G. Lack of effect of naltrindole on the spinal synergism of morphine and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSADS). *J Physiol Pharmacol.* 2009;60:71-6.
41. Rosenbrock H, hagemeyer CE, Ditter M, Knoth R, Volk B. Predominantly neuronal expression of cytochrome P450 isoforms CYP3A11 and CPY3A13 in mouse brain. *Neuroscience.* 2003;117:521-9.
42. Wong-Riley MT, Kageyama GH. Localization of cytochrome oxydase in the mammalian spinal cord and dorsal root ganglia, with quantitative analysis of ventral horn cells in monkey. *J Comp Neurol.* 1986;245:41-61.
43. Jean YH1, Wen ZH, Chang YC, Hsieh SP, Tang CC, Wang YH et al. Intra-articular injection of the cyclooxygenase-2 inhibitor parecoxib attenuates osteoarthritis progression in anterior cingulated ligament-transected knee in rats: role of excitatory aminacids. *Osteoarthr Cartilage.* 2007;15:638-45.
44. Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurological outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology.* 1989;70:64-70.
45. 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 (marcaineR). *Acta Anaesth Scand.* 1979;23:127-136.
46. Moore S, Thanos S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Nerobiol.* 1996;48:441-60.
47. Adams HJ, Mastri AR, Eicholzer AW, Kilpatrick G. Morphologic effects of intrathecal etidocaine and tetracaine on the rabbit spinal cor. *Anest Analg.* 1974;53:904-908.
48. Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, Austin E, Sumi SM. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology.* 1985;63:364-370.
49. Santos ALQ, Lima EMM, Santana MIS. Length of spinal cord and topography of medular cone in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Biosciene Journal (UFU).* 1999;15:45-62.
50. Ting PH, Antonakakis JG. Evidence based review of ultrasound imaging for regional anesthesia. *Semin Anesth.* 2007;26:218-28.
51. Rosen MA, Baysinger CL, Shnider SM, Dailey PA, Norton M, Curtis JD, et al. Evaluation of neurotoxicity after subarachnoid injection of large volumes of local anesthetic solutions. *Anesth Analg.* 1983;62:802-808.

52. 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 Anaesthesiol.* 1992;69:433-438.
53. Ganem EM, Vianna PTG, Marques M, Castiglia LA, Vane LA. Efeitos da administração subaracnoidea de grandes volumes de lidocaína 2% e ropivacaina 1% sobre a medula espinhal e as meninges. Estudo experimental no cão. *Rev Bras Anesthesiol.* 2003;53:351-360.
54. Okagawa SR, Ganem EMG, 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;56:253-262.
55. Ganem EM, Vianna PTG, Marques M, Castiglia YMM, Vane LA. Neurotoxicity of subarachnoid hyperbaric bupivacaine in dogs. *Reg Anesth.* 1994;21:234-38.
56. Barros GAM, Marques MEA, Ganem EM. The effects of intrathecal administration of betamethasone over dogs spinal cord and meninges. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2007;22; 361-5.
57. Fukushima FB; Barros GAM; Marques MEA, Vidal EIO, Ganem EM. The neuraxial effects of intraspinal amitriptyline at low concentrations. *Anesth Analg.* 2009;109:965-71.
58. Lima RM, Navarro LH, Carness JM, Barros GA, Marques MEA, Solanki D, et al. Clinical and histological effects of the intrathecal administration of methylprednisolone in dogs. *Pain Physician.* 2010;13:493-501.
59. Kane RE. Neurologic deficits following epidural or spinal anesthesia. *Anesth Analg.* 1981;60:150-161.
60. Rice I, Wee MY, Thomson K. Obstetric epidurals and chronic adhesive arachnoiditis. *Br J Anaesth.* 2004;92:109-20.
61. Greene NM. Neurological sequelae of spinal anesthesia. *Anesthesiology.* 1961;22:682-689.
62. Jaradeh S. Cauda equina syndrome: A neurologist's perspective. *Reg Anesth.* 1993;18:473-480.
63. Wang BC, Hillman DE, Spielholz, Neil I, Turndorf, H. Subarachnoid sodium bisulfite (the antioxidant in nesacaine) causes chronic neurological deficit. *Anesthesiology.* 1982;57:194.
64. Marteleite M - Sequelas neurológicas de anestésias peridurais. Relato de 4 casos. *Rev Bras Anesthesiol.* 1981;31:245-250.

65. Bosscher HA, Glitin MG. Epidural steroid injection. In Raj PP, ed. Textbook of Regional Anesthesia. New York: Churchill Livingstone. 2002:687-702.