



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

**Denise Moroto**

**A dexametasona administrada pela via subaracnoidea é  
tóxica à 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(a) em Anestesiologia.

Orientador(a): Prof(a). Titular Eliana Marisa Ganem

**Botucatu  
2018**

*Denise Moroto*

**A dexametasona administrada pela via  
subaracnoidea é tóxica à medula espinal e meninges  
de coelhos?**

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

**Prof<sup>a</sup>. Titular Eliana Marisa Ganem**

Orientadora

**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

Moroto, Denise.

A dexametasona administrada pela via subaracnóidea é tóxica à medula espinal e as meninges de coelhos? / Denise Moroto. - Botucatu, 2017

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

Orientador: Eliana Marisa Ganem

Capes: 40102130

1. Coelho. 2. Anestésicos - Complicações. 3. Medula espinal. 4. Dexametasona. 5. Meninges.

Palavras-chave: Coelhos; Complicações; Corticosteroides; Injeção subaracnoidea.

## ***DEDICATÓRIAS***

Dedico este trabalho a Deus que, em sua infinita bondade, compreendeu meus anseios e deu-me forças para atingir meus objetivos.

Aos meus pais, Paulo e Edna, que me ensinaram o valor da persistência, do esforço e do trabalho.

Aos meus familiares que souberam, com paciência, superar as minhas ausências e deram-me encorajamentos sem nada me cobrar.

Aos meus amigos e a todos aqueles que, embora os nomes não estejam aqui presentes, expressaram satisfação e se preocuparam com a minha trajetória durante a realização desse trabalho.

## ***AGRADECIMENTOS***

***À minha orientadora, Profª. Titular Eliana Marisa Ganem*** meus sinceros agradecimentos pela orientação mais que profissional, humana. Obrigada por transmitir sua experiência valiosa, por apoiar-me em minhas dificuldades e pela amizade.

*Agradeço a todos aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho e, em particular:*

À Deus, que em sua infinita bondade, permitiu que eu alcançasse mais essa conquista.

À minha amiga Ana Lygia Rochitti de Carvalho, por todo o apoio e ajuda durante a realização desse trabalho.

À minha família, meu alicerce, pela paciência, incentivo e carinho.

Aos docentes do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, por todos os ensinamentos ao longo da minha formação como especialista e também durante esta etapa da minha formação.

Aos funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela disposição em me ajudar sempre que necessário para a confecção deste trabalho.

Ao graduando do curso de Medicina da Faculdade de Medicina de Botucatu Ricardo dos Santos Zuza, pela ajuda durante a fase experimental desta pesquisa.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Maria Vasconcelos Machado, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, pelo auxílio com a ultrassonografias.

À Prof<sup>a</sup>. Adjunta Mariângela Esther Alencar Marques, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio na análise histológica das lâminas.

Ao Prof. Dr. Hélio Miot, do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela ajuda na avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos.

À FAPESP pelo auxílio necessário para o desenvolvimento deste estudo.



*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes. “*

***Martin Luther King***

***RESUMO E ABSTRACT***

Moroto D. *A dexametasona administrada pela via subaracnoidea é tóxica à medula espinal e meninges de coelhos?* Botucatu, 2018. 79p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## Resumo

**Introdução:** Dor perioperatória desencadeia resposta neuroendócrina ao estresse, responsável por efeitos adversos em vários órgãos e sistemas. Estratégias foram desenvolvidas para controle da dor e dessa resposta ao trauma, como a injeção de dexametasona, glicocorticoide de alta potência, no espaço peridural e subaracnoideo. Embora a injeção de corticosteroides no neuroeixo seja realizada com aparentes benefícios em seres humanos no contexto da dor aguda e crônica, a eficácia e segurança desse procedimento continuam discutíveis e alvo de controvérsia na literatura. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos histológicos que a dexametasona administrada no espaço subaracnoideo determina sobre o tecido nervoso da medula espinal e das meninges dos coelhos. **Método:** Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais, 28 coelhos adultos jovens foram randomizados em dois grupos (G) experimentais com 14 animais cada: G1 recebeu solução salina a 0,9% pela via subaracnoidea e G2, dexametasona na dose de 0,37 mg.kg<sup>-1</sup>. Os animais foram mantidos em cativeiro por 21 dias, durante os quais se avaliou motricidade e sensibilidade dolorosa. Depois desse período, sob anestesia venosa, foram submetidos a sacrifício para retirada da porção lombar e sacral da medula espinal e das meninges para avaliação histológica pelo método de Hematoxilina-eosina (HE) e de marcação imuno-histoquímica para Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP). **Resultados:** Todos os animais permaneceram sem alterações clínicas durante o período de cativeiro. Nenhum animal do G1 apresentou alterações histológicas à microscopia óptica. No G2, 13 animais exibiram infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular nos vasos das meninges, com ou sem acometimento também das meninges e do parênquima nervoso. Os animais do G2 também tiveram percentual de células marcadas pelo GFAP inferior aos do G1 (p<0,05). **Conclusão:** Neste modelo experimental em coelhos, a solução de dexametasona determinou alterações histológicas no tecido nervoso da medula espinal e, principalmente, nas meninges.

**Palavras chave:** *Dexametasona; punção subaracnoidea; neurotoxicidade; coelho; toxicidade meníngea.*

Moroto D. *Is intrathecal dexamethasone toxic to the spinal cord and meninges of rabbits?* Botucatu, 2018. 79p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology) – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## **Abstract**

**Background:** Perioperative pain triggers neuroendocrine response to stress, responsible for adverse effects on various organs and systems. Strategies were developed to control pain and this response to trauma, such as the injection of dexamethasone, a high-potency glucocorticoid, into the epidural and subarachnoid space. Although corticosteroid spinal injection is performed with apparent benefits in humans in the context of acute and chronic pain, the efficacy and safety of this procedure remain controversial in the literature. The objective of this study was to evaluate the histological effects that dexamethasone administered into the subarachnoid space determines on the nervous tissue of the spinal cord and the meninges of rabbits. **Methods:** After approval by the animal research ethics committee, 28 young adult rabbits were randomized in two experimental groups (G) with 14 animals each: G1 received 0.9% saline solution into the intrathecal space and G2 received 0.37mg.kg<sup>-1</sup> of dexamethasone by the same route. The animals were clinically evaluated for 21 days. After this period of observation, sacrifice was performed under intravenous anesthesia and then the lumbar and sacral portion of their spinal cords were removed for histological examination by Hematoxylin-eosin (HE) and Glial Fibrillary Acidic protein (GFAP) immunohistochemical staining. **Results:** All animals remained without clinical changes during the period of captivity. No histological changes were observed in G1 animals. In G2, 13 animals exhibited perivascular lymphoplasmocytic inflammatory infiltrate in the meninges vessels, with or without involvement of the meninges and the nervous parenchyma. G2 animals also showed lower percentage of GFAP stained cells than rabbits of G1 (p<0.05). **Conclusion:** In this experimental model, the dexamethasone solution determined histological changes in the nervous tissue of the spinal cord and, especially, the meninges of rabbits.

**Keywords:** *Dexamethasone; intrathecal injection; neurotoxicity syndrome; rabbits; spinal anesthesia.*

***LISTAS***

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Organograma da avaliação histológica.....	44
<b>Figura 2</b>	Segmento das regiões anterior e posterior da medula espinal.....	45
<b>Figura 3</b>	A. Área selecionada do tecido neural. B. Área binarizada após o processamento da imagem.....	47
<b>Figura 4</b>	Tecido nervoso (A), meninges (B) e vasos sanguíneos (C) normais em animal de G1. HE 40x.....	53
<b>Figura 5</b>	Tecido nervoso (A), meninges (B) e vasos sanguíneos (C) normais em animal de G1. HE 100x.....	54
<b>Figura 6</b>	Tecido nervoso normal (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B, C) em animal de G2 (coelho 2) .....	55
<b>Figura 7</b>	Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intraparenquimatoso (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B) em animal de G2 (coelho 3) .....	56
<b>Figura 8</b>	Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter. Espaço de Virchow-Robin em animal de G2 (coelho 9) .....	57
<b>Figura 9</b>	Tecido nervoso normal (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B, C) em animal de G2 (coelho 9) .....	58
<b>Figura 10</b>	Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B, C) em animal de G2 (coelho 9) .....	59
<b>Figura 11</b>	Tecido nervoso normal (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter e aracnoide (B), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular nos vasos da pia-máter e aracnoide em animal de G2 (coelho 12) .....	60
<b>Figura 12</b>	Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular intraparenquimatoso (C) em animal de G2 (coelho 12) .....	61

**Figura 13** Tecido nervoso normal (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular intraparenquimatoso (C), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter (D) em animal de G2 (coelho 12)

..... 62

**Figura 14** Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intraparenquimatoso (A) e nos vasos intraparenquimatosos (C) em animal de G2 (coelho 2)

..... 63

**Figura 15** *Box-plot* da mediana e 1º e 3º quartis do percentual de células marcadas pelo GFAP nos grupos estudados..... 64

## Lista de Quadros

<b>Quadro 1</b>	Algoritmo de processamento das imagens para quantificação imuno-histoquímica.....	46
-----------------	---	----



## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Peso e volume da solução administrada nos dois grupos experimentais.....	50
<b>Tabela 2</b>	Resultados histológicos do tecido nervoso, dos vasos sanguíneos e das meninges dos animais pertencentes ao G2.....	51

## Lista de Abreviaturas e Siglas

<b>A</b>	Aracnoide
<b>An</b>	Anterior
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animal
<b>D</b>	Dura-máter
<b>DM</b>	Denise Moroto
<b>EMG</b>	Eliana Marisa Ganem
<b>FAERS</b>	<i>Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>G1</b>	Grupo 1
<b>G2</b>	Grupo 2
<b>GFAP</b>	Proteína Glial Fibrilar Ácida
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>MEAM</b>	Mariângela Esther Alencar Marques
<b>L</b>	Lateral
<b>P</b>	Pia-máter
<b>Po</b>	Posterior
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada
<b>RGC</b>	Receptores Glicocorticoides
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TDI</b>	Doppler Tecidual de Parede
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral

**USA**

United States of America

## Lista de Símbolos

$p < 0,05$	estatisticamente significativo
$p > 0,05$	não significativo estatisticamente
%	porcentagem

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
<b>2. HIPÓTESE DO ESTUDO.....</b>	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>32</b>
<b>4. MÉTODO.....</b>	<b>34</b>
4.1 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL.....	35
4.2 MODELO DE ESTUDO.....	35
4.3 AMOSTRA.....	35
4.3.1 <b>Animais utilizados.....</b>	35
4.3.2 <b>Grupos experimentais.....</b>	36
4.3.3 <b>Justificativa para a composição dos grupos experimentais.....</b>	36
4.4 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL.....	36
4.5 TÉCNICAS UTILIZADAS.....	37
4.5.1 <b>Preparo do animal.....</b>	37
4.5.2 <b>Anestesia subaracnóidea.....</b>	38
4.5.2.1 <i>Técnica de punção.....</i>	38
4.5.2.2 <i>Volume injetado.....</i>	39
4.5.2.3 <i>Solução administrada.....</i>	39
4.5.3 <b>Observação clínica.....</b>	39
4.5.4 <b>Sacrifício.....</b>	40
4.5.5 <b>Exame histológico.....</b>	40
4.6 MÉTODO ESTATÍSTICO.....	47
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	71
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>

<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>74</b>
----------------------------	-----------

# ***INTRODUÇÃO E LITERATURA***

## 1. INTRODUÇÃO E LITERATURA

Dor perioperatória é fator desencadeador da resposta neuroendócrina ao estresse, ativa o sistema autonômico e é causa indireta de efeitos adversos em vários órgãos e sistemas.<sup>1</sup>

A resposta neuroendócrina ao estresse corresponde às mudanças hormonais e metabólicas que ocorrem no organismo após lesão ou trauma. É caracterizada pelo aumento da secreção de hormônios hipofisários e pela ativação do sistema nervoso simpático. O efeito metabólico global das mudanças hormonais é o aumento do catabolismo, que mobiliza substrato para a produção de energia, e a retenção de sódio e água, de modo a manter a volemia e a homeostase cardiovascular.<sup>2</sup>

O início da resposta ao estresse é decorrente de impulsos nervosos aferentes do sítio de lesão combinados com a liberação local de fatores humorais como prostaglandinas, leucotrienos, interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF).<sup>3</sup>

Apesar de parecer que a resposta ao estresse foi desenvolvida para permitir que animais feridos sobrevivessem por meio do catabolismo de suas reservas, complicações pós-operatórias como infarto do miocárdio, infecção pulmonar, tromboembolismo e fadiga estão relacionadas às mudanças fisiológicas provocadas por essa resposta.<sup>2,4</sup> Há, portanto, correlação entre dor pós-operatória incontrolável e aumento da morbimortalidade dos pacientes. Além disso, a dor causa prolongamento do tempo de recuperação, aumento de custos com saúde e diminuição da satisfação do paciente.<sup>1,5</sup>

Dessa forma, é fundamental o desenvolvimento de estratégias para diminuição da dor no período perioperatório e para atenuação da resposta neuroendócrina ao trauma cirúrgico.

A busca de maneira segura e eficiente para controlar a dor faz parte da história da humanidade. As propriedades analgésicas e de alteração mental causadas pelo ópio são conhecidas há muito tempo. No início do século XIX (1805), foi isolado o poderoso princípio ativo do ópio, o “morphium”, assim denominado em homenagem ao Deus grego do sono Morpheus, hoje conhecido como morfina.<sup>6</sup>



No decorrer do tempo, foram sintetizados muitos outros fármacos opioides, que se tornaram uma das principais alternativas para o controle da dor. Entretanto, apesar da potência analgésica, existem importantes efeitos colaterais decorrentes da terapia com opioides.<sup>6</sup>

Novos fármacos começaram então a ser pesquisados como alternativas para o tratamento da dor, como os anti-inflamatórios esteroides, que possuem efeitos bem conhecidos e complexos, pois regulam vias de transcrição em diferentes contextos celulares. Eles influenciam não somente a inflamação, mas também o desenvolvimento, a homeostase, o metabolismo e a cognição.<sup>7,8</sup> Podem ser classificados de acordo com sua potência anti-inflamatória e capacidade de retenção de sódio, além de serem utilizados em medicina tanto por suas propriedades anti-inflamatórias quanto imunossupressoras.<sup>9</sup> Também são classificados quanto à solubilidade: sem partículas (solúveis), como o fosfato dissódico de dexametasona e o fosfato dissódico de betametasona, e com partículas (insolúveis), como o acetato de metilprednisolona e o acetato de betametasona.<sup>10</sup>

Os glicocorticoides penetram facilmente nas células e agem em todos os tecidos, inclusive no SNC. No citosol exercem efeito genômico clássico pela ligação aos receptores mineralocorticoides ou glicocorticoides (RGC). Existem duas isoformas de RGC: a alfa, expressa em quase todos os tipos de células, e a isoforma beta, que não se liga aos glicocorticoides, exercendo papel de resistência aos mesmos.<sup>9,11</sup> O complexo glicocorticoide – RGC penetra o núcleo celular, onde liga-se a sítios específicos do DNA e desencadeia efeitos genômicos, que consistem na inibição da transcrição de fatores pró-inflamatórios, redução da síntese de citocinas pró-inflamatórias ao mesmo tempo em que ativa outros genes anti-inflamatórios.<sup>9</sup>

Os mecanismos pelos quais os corticosteroides exercem efeito analgésico são objeto de estudo há muitos anos. Corticosteroides inibem a enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, que catalisa a conversão de fosfolípidos de membrana em ácido aracídico (AA), substrato para as vias da ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase. O metabolismo por essas vias resulta na produção de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanas e leucotrienos, que podem causar ou exacerbar a dor por seus efeitos inflamatórios e habilidade de sensibilizar nociceptores periféricos.<sup>12</sup>

A dexametasona é um glicocorticoide de alta potência, de longa duração e com pouco efeito mineralocorticoide, utilizado em anestesia para profilaxia de náuseas no período pós-operatório.<sup>5</sup> A administração de doses únicas de dexametasona e outros glicocorticoides foi associada à melhora da analgesia em diferentes procedimentos cirúrgicos, seja por via oral ou intravenosa.<sup>5</sup>

Resultados de revisão sistemática mostraram que a dexametasona como adjuvante de anestésico local, administrada pela via perineural para bloqueios de plexo braquial, prolongou a duração do bloqueio sensitivo/analgesia.<sup>13</sup> Alguns autores descreveram que a dexametasona, independentemente da via de administração (perineural ou intravenosa), prolongou a duração da analgesia do bloqueio interescalênico com ropivacaína.<sup>14</sup> Ainda outros encontraram aumento no tempo de duração da analgesia quando empregaram o fármaco pela via perineural em bloqueio do nervo ciático, porém com duração semelhante ao da dexametasona utilizada pela via intravenosa.<sup>15</sup>

Corticosteroides pela via peridural são utilizados para o controle não só da dor pós-operatória, mas também para o tratamento de dor lombar.<sup>16</sup> O primeiro registro da injeção de corticosteroides no espaço peridural para tratamento de dor lombar crônica data de 1952 e, desde então, médicos têm comumente empregado corticosteroides por essa via para manejo da dor lombar crônica.<sup>17</sup>

Pela via peridural, a dexametasona, associada ou não à bupivacaína, foi eficaz em reduzir a dor pós-operatória e o consumo de morfina após colecistectomia videolaparoscópica.<sup>18</sup> Em conjunto com bupivacaína no espaço peridural, também prolongou significativamente a analgesia pós-operatória em pacientes submetidos a herniorrafia inguinal unilateral.<sup>19</sup> Administrada no espaço peridural associada à bupivacaína, apresentou comportamento similar no alívio da dor e no aumento do tempo de analgesia após cirurgias de abdome inferior ao que foi observado com a associação entre a bupivacaína e o fentanil.<sup>5</sup> Na administração em conjunto com fentanil e bupivacaína no espaço peridural prolongou o tempo de analgesia após cirurgias abdominais e torácicas.<sup>20</sup> Em crianças submetidas à orquidopexia, a dexametasona aumentou a duração da analgesia do bloqueio caudal com ropivacaína.<sup>21</sup> Resultado de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Saúde Aplicadas ao Aparelho Locomotor da Faculdade de

Medicina de Ribeirão Preto USP mostrou que a dexametasona administrada pela via peridural associada à dipirona injetada pela via intravenosa foi eficaz em aumentar o tempo de analgesia e em reduzir o consumo de analgésico após cirurgias ortopédicas de joelho.<sup>22</sup> Também foi verificada efetividade no aumento do tempo de analgesia pós-operatória em pacientes submetidos a gastrectomia com o uso de dexametasona peridural juntamente com ropivacaína.<sup>16</sup>

Embora o mecanismo analgésico dos esteroides peridurais ainda não seja claramente conhecido, parece estar associado com a ação anti-inflamatória, redução de edema e diminuição do tecido conjuntivo. Além disso, foi reportado que a aplicação local de corticosteroides bloqueia a transmissão em fibras nociceptivas C e que corticosteroides podem ter efeito de anestésico local nos nervos por ação direta na membrana. Outro possível mecanismo envolve o efeito dos corticoides peridurais na formação de prostaglandinas intraespinhais. O estímulo nócico agudo nos tecidos periféricos durante os procedimentos cirúrgicos levam a ativação da fosfolipase A2 e a *“up regulation”* da expressão da cicloxigenase-2 (COX-2) na medula espinal, o que leva à síntese de prostaglandinas e resulta em hiperalgesia. Os bloqueios com corticosteroides, quando realizados no período perioperatório, reduzem essa resposta e suprimem a hiperalgesia por inibição das enzimas fosfolipase A2 e da COX-2.<sup>16</sup>

Corticosteroides pela via subaracnoidea realizados experimentalmente em pacientes com neuralgia pós-herpética grave resultaram em melhora do quadro.<sup>23</sup> Dexametasona subaracnoidea juntamente com levobupivacaína foi empregada em pacientes submetidas a duplo bloqueio para analgesia de parto vaginal com aumento do tempo de analgesia.<sup>24</sup> A dexametasona pela mesma via associada à bupivacaína resultou em aumento do tempo de analgesia em pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas.<sup>25</sup>

O raciocínio para o uso subaracnoideo de corticosteroides surgiu da possibilidade de ação direta do fármaco no tecido nervoso inflamado, o que poderia reduzir dor, edema e aliviar sintomas neurológicos. Outra possível vantagem dessa via seria a menor dose terapêutica necessária para se obter o mesmo efeito da administração sistêmica, com diminuição de efeitos adversos.<sup>23</sup>

Embora corticosteroides no neuroeixo estejam sendo empregados com aparentes benefícios em seres humanos, sua eficácia e segurança continuam discutíveis e alvo de controvérsia na literatura.<sup>26</sup>

As injeções peridurais de corticosteroides para o manejo da dor radicular cervical e lombar correspondem a uso não regulamentado pelo Food and Drug Administration (FDA). Em 2009, o FDA começou a avaliar série de graves eventos neurológicos associados a injeções peridurais de glicocorticoides. Entre 1997 e 2014, um total de 90 eventos neurológicos graves e, às vezes, fatais foram reportados ao FDA Adverse Event Reporting System (FAERS), incluindo casos de paraplegia, quadriplegia, infarto medular e acidente vascular cerebral.<sup>27</sup> Dentre os potenciais agentes determinantes dessas complicações, encontra-se a injeção inadvertida de corticosteroides no espaço subaracnoideo.<sup>27</sup>

Em relação às injeções subaracnoideas de corticosteroides, uma variedade de eventos adversos já foi reportada, entre eles, meningite química, mielite transversa, síndrome de cauda equina, radiculite lombar, cefaleia intratável, retenção urinária e aracnoidite adesiva.<sup>23</sup>

Em estudos experimentais com modelos animais, o uso subaracnoideo de betametasona e de metilprednisolona em cães foi associado a aracnoidite adesiva.<sup>17,28</sup> A aracnoidite adesiva também foi relacionada a injeções acidentais de corticosteroides de depósito e, embora acredite-se que o risco de ocorrência da doença seja menor com injeções inadvertidas de corticosteroides hidrossolúveis como a dexametasona, quase nada se conhece do assunto.<sup>18,29,30</sup>

Contrastes iodados, corticosteroides administrados no espaço peridural e no subaracnoideo, trauma, sangue, quimioterápicos, preservativos e conservantes contidos em muitas soluções, contaminantes como detergentes e até mesmo anestésicos locais, foram associados à aracnoidite adesiva.<sup>31</sup>

A aracnoidite adesiva é uma doença inflamatória incurável, considerada uma das complicações mais graves dos bloqueios do neuroeixo. A aracnoidite adesiva possui quadro clínico complexo, com variedade de sintomas e de diagnóstico clínico difícil porque os sinais e sintomas são inespecíficos. As características clínicas mais frequentes são a dor nas costas, que aumenta de intensidade com a atividade, a dor

nas pernas, geralmente bilateral, a hiporreflexia, a diminuição da amplitude da movimentação do tronco, as alterações sensitivas, a dificuldade em manter as pernas elevadas e a disfunção do esfíncter urinário.<sup>32</sup>

Apesar de a aracnoidite adesiva ter sido verificada após a injeção subaracnoidea de metilprednisolona e de betametasona em cães, a injeção peridural de metilprednisolona em coelhos não desencadeou alterações histológicas nas meninges.<sup>33</sup> Em ratos, a injeção subaracnoidea da triancinolona através de cateter implantado cronicamente não causou alterações histológicas do tecido nervoso, porém este estudo não avaliou as meninges.<sup>34</sup>

Estudos para a investigação do potencial neurotóxico da dexametasona também já foram realizados "in vitro". Ao administrar ropivacaína em neurônios sensitivos isolados de nervos periféricos de ratos, verificou-se que o anestésico local foi tóxico aos neurônios isolados e que a adição de dexametasona em altas doses à ropivacaína aumentou a toxicidade da mesma.<sup>35</sup> Entretanto, neurônios isolados são previamente lesados e podem superestimar o potencial tóxico dos medicamentos, uma vez que nervos isolados não apresentam barreiras de difusão ou vascularização que favorecem a remoção dos agentes, resultando em altas concentrações dos fármacos em contato com a membrana neural.<sup>35</sup>

No contexto da lesão no sistema nervoso central (SNC), o papel dos astrócitos tem sido bastante estudado. Astrócitos são células da micróglia que respondem a todas as formas de insultos ao SNC por meio de hipertrofia e proliferação, processo denominado de ativação astrocitária reativa. Tradicionalmente, essa resposta é vista como barreira à regeneração nervosa.<sup>36</sup>

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é o principal componente do citoesqueleto dos astrócitos e técnicas de imunohistoquímica com anticorpos anti-GFAP são empregadas para identificar a ativação astrocitária, de modo a funcionar como marcador precoce de acometimento do SNC.<sup>36,37</sup>

Ainda que corticosteroides no neuroeixo sejam utilizados há algumas décadas, não é claro se os benefícios da administração subaracnoidea superam os riscos.<sup>26</sup> Além disso, mesmo que a administração não ocorra no espaço subaracnoideo, sempre que se administra uma substância no espaço peridural existe

o risco de 5% a 7% de que haja introdução inadvertida acidental no subaracnoideo.<sup>31</sup> Também, é interessante lembrar que, mesmo que não haja acidentes de punção, os espaços peridural e subaracnoideo não são inteiramente separados, e que soluções introduzidas em um deles podem ter efeitos no outro.<sup>31</sup>

É importante, portanto, que sejam conhecidos os efeitos da dexametasona em animais vivos e em situação de adversidades. Uma vez que a administração de outros corticosteroides pela via subaracnoidea causou aracnoidite adesiva seria interessante conhecer o comportamento que este fármaco determina sobre os tecidos do neuroeixo.

## ***HIPÓTESE DO ESTUDO***

## **2. HIPÓTESE DO ESTUDO**

A dexametasona não desencadeia toxicidade sobre o tecido nervoso e pode causar toxicidade às meninges em modelo experimental “in vivo”.



## ***OBJETIVO***

### **3. OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos histológicos que a dexametasona administrada no espaço subaracnoideo determina sobre o tecido nervoso da medula espinal e das meninges de coelhos.

## ***MÉTODO***

## **4. MÉTODO**

### **4.1 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL (CEUA)**

A presente pesquisa foi submetida à aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo CEUA 1113/2014).

### **4.2 MODELO DE ESTUDO**

Este estudo foi controlado e randomizado.

Os grupos foram randomizados a partir de lista gerada por computador (Randon.org Dublin Ireland) e a ocultação da alocação foi feita por envelopes selados opacos.

A preparação das soluções administradas em todos os animais foi realizada por profissional não envolvido na pesquisa. A análise histológica dos resultados foi encoberta.

### **4.3 AMOSTRA**

#### **4.3.1 Animais utilizados**

Foram utilizados 28 coelhos adultos jovens, fêmeas, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 3300 gramas e 4300 gramas, 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.

### 4.3.2 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos experimentais de acordo com a solução a ser administrada no espaço subaracnoideo:

- Grupo 1 (G1) – salina a 0,9%
- Grupo 2 (G2) – dexametasona 0,37 mg.kg<sup>-1</sup>

### 4.3.3 Justificativa para a composição dos grupos experimentais

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

O grupo 2, que recebeu a dexametasona, por sua vez, teve a finalidade de avaliar os efeitos do fármaco sobre o tecido nervoso e as meninges. A dose de dexametasona foi selecionada tomando como base o estudo realizado em coelhos que receberam a metilprednisolona na dose de 2mg.kg<sup>-1</sup> de peso corpóreo.<sup>33</sup> Como a dexametasona apresenta potência relativa 5 vezes maior do que a da metilprednisolona (4 mg de metilprednisolona correspondem a 0,75 de dexametasona), a dose de 2 mg.kg<sup>-1</sup> de metilprednisolona corresponde a 0,37 mg.kg<sup>-1</sup> de dexametasona.

## 4.4 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

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

- Jejum alimentar de 12 horas com livre acesso a água.
- Pesagem.
- Anestesia com xilazina e cetamina.
- Posicionamento do animal em decúbito ventral na mesa.
- Limpeza local com água e sabão.

- Tricotomia.
- Limpeza do local com solução salina 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 cirúrgica.
- Observação clínica até recuperação da anestesia venosa.
- Manutenção em cativeiro durante 21 dias sob observação clínica.
- Sacrifício do animal.
- Remoção da medula espinal em sua porção lombar e sacral.
- Fixação da peça anatômica.
- Análise da histologia.

## 4.5 TÉCNICAS UTILIZADAS

### 4.5.1 Preparo do animal

Após período de jejum de 12 horas com livre acesso a 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.

Foi realizada a limpeza da pele e dos pêlos da região da coluna vertebral com água e sabão seguida de tricotomia em área de 5 centímetros (cm) ao redor do

local onde foi realizada a punção, correspondente ao espaço intervertebral S1-S2. Esta região foi lavada com salina a 0,9% e, após a antissepsia com solução tópica de gluconato de clorexidina a 2%, foram colocados os campos estéreis.

## **4.5.2 Anestesia subaracnóidea**

### *4.5.2.1 Técnica de punção*

Em modelo experimental de estudo dos efeitos tóxicos de fármaco administrado 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 na espécie animal estudada. No coelho, este espaço encontra-se entre as vértebras S1 e S2.

Para determinação do local de punção, 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 subaracnoideo foi guiado com auxílio de 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 10MHz.

A punção 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 atingir o ligamento amarelo. A partir deste local, a punção foi guiada pelo ultrassom até a agulha penetrar no espaço subaracnoideo e os fármacos serem introduzidos no líquido.

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

#### 4.5.2.2 *Volume injetado*

Em G1 foi administrado solução salina a 0,9% em volume correspondente a 0,37 mg.kg<sup>-1</sup> de dexametasona.

O G2 recebeu dexametasona em volume correspondente a 0,37 mg.kg<sup>-1</sup>.

#### 4.5.2.3 *Solução administrada*

A salina a 0,9% (Grupo 1) e fosfato dissódico de dexametasona (Grupo 2) foram sintetizados pela Hipolabor Farmacêutica Ltda, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

### **4.5.3 Observação clínica**

Após 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 avaliação da motricidade foi baseada no critério estabelecido por Drummond & Moore<sup>38</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.

A avaliação da sensibilidade dolorosa foi realizada por meio de preensão nas extremidades inferiores e superiores, bem como da pele da região dos dermatômos sacrais, lombares, torácicos e da orelha, com auxílio de pinça dente de rato. Foram observados os seguintes sinais indicativos de dor:

- retração da pata;
- mudança de postura;
- gemência após a aplicação dos estímulos dolorosos descritos.

Os animais permaneceram em cativeiro durante 21 dias sob observação clínica.

#### **4.5.4 Sacrifício**

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

#### **4.5.5 Exame histológico**

As peças anatômicas permaneceram, durante sete dias, em solução de formalina tamponada. Os cortes transversais do tecido nervoso e das meninges iniciaram-se, aproximadamente, 10 cm acima do local onde foi realizada a punção subaracnoidea, e estenderam-se até o final da cauda equina, em intervalos de 1 (um) centímetro.

Os cortes do tecido medular foram colocados em blocos de parafina e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) e de imuno-histoquímica para o marcador glial GFAP.

Para realização da técnica de imuno-histoquímica para GFAP, as amostras incluídas em parafina foram seccionadas na espessura de 3 micra em micrótomo rotativo e estendidas em lâminas histológicas de vidro previamente tratadas com organo-silano. Depois de permanecerem por 18 horas em estufa a 58°C, os cortes passaram pelo processo de desparafinização em três cubas com xilol no tempo de 5 minutos em cada uma delas, hidratação em água corrente e destilada.

A próxima etapa realizada foi o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos em temperatura ambiente e, após as lâminas serem lavadas em água destilada, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor em panela pressurizada Pascal (Dako) por 3 minutos em temperatura de 117°C em solução Trilogy (Cell Marque).

Seguindo-se a lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas foram transferidas para bandejas especiais para imuno-histoquímica, sendo os cortes cobertos por PBS (solução salina tamponada pH 7,2 – 7,4) e depois de retirado o excesso desta solução, receberam o anticorpo primário anti-GFAP, clone 6F2 (Dako) previamente diluído a 1:400, permanecendo assim incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram retirados por meio de lavagem em PBS e incubados com o anticorpo secundário e terciário Hides Polímero (Cell Marque) durante 10 minutos, cada uma das incubações, em temperatura ambiente.

Os cortes novamente lavados em PBS foram revelados pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina (Cell Marque) e, após a revelação, foram lavados em água corrente e contra corados em hematoxilina segundo Harris (MERCK) por 1 (um) minuto. Os cortes então passaram pelo processo de desidratação em 4 cubas com etanol absoluto e diafanização em 3 cubas com xilol. Por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas 24x32 (KNITTEL) por meio de resina sintética Permout (FISHER – SP 15-500) e lidas em microscópio óptico.

O exame histológico das lâminas foi efetuado pela microscopia óptica. Os resultados obtidos pela análise dos cortes do tecido nervoso e das meninges corados pela HE foram classificados como normais, quando não apresentaram alterações, ou lesados. Quando lesões foram identificadas, os seguintes critérios foram determinados:

- tipo de lesão:
  - 1 – aracnoidite
  - 2 – aracnoidite + lesão nervosa
  - 3 – lesão nervosa
- localização da lesão:
  - 1 – região posterior (Po)
  - 2 – região lateral (L)
  - 3 – região anterior (An)
  - 4 – Po + L
  - 5 – L + An
  - 6 – Po + L + An
- 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 (D) + aracnoide (A)

2 – A + pia-máter (P)

3 – D + A + P

- espessamento de meninge:

0 – ausente

1 – leve

2 – moderado

3 – intenso

- infiltrado linfoplasmocitário:

0 – ausente

1 – muito leve (1/2 +)

2 – leve (+)

3 – moderado (++)

4 - intenso (+++)

- fibrose:

0 – ausente

1 – leve

2 – moderada

3 – intensa

Na presença de lesão de nervo:

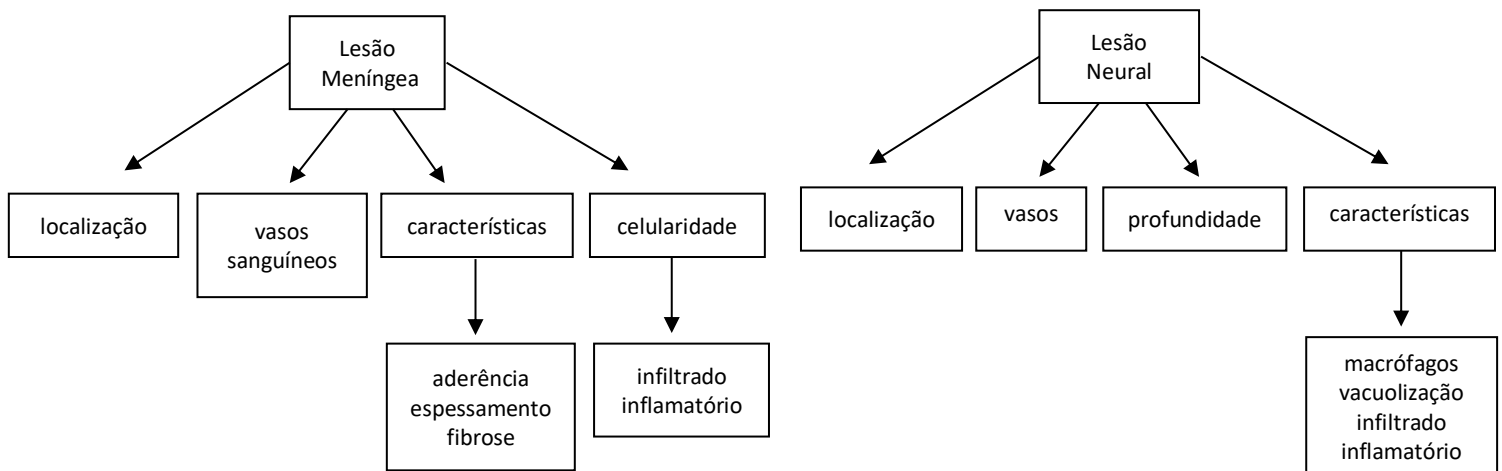
1- vacuolização

2- infiltrado linfoplasmocitário

3- macrófagos

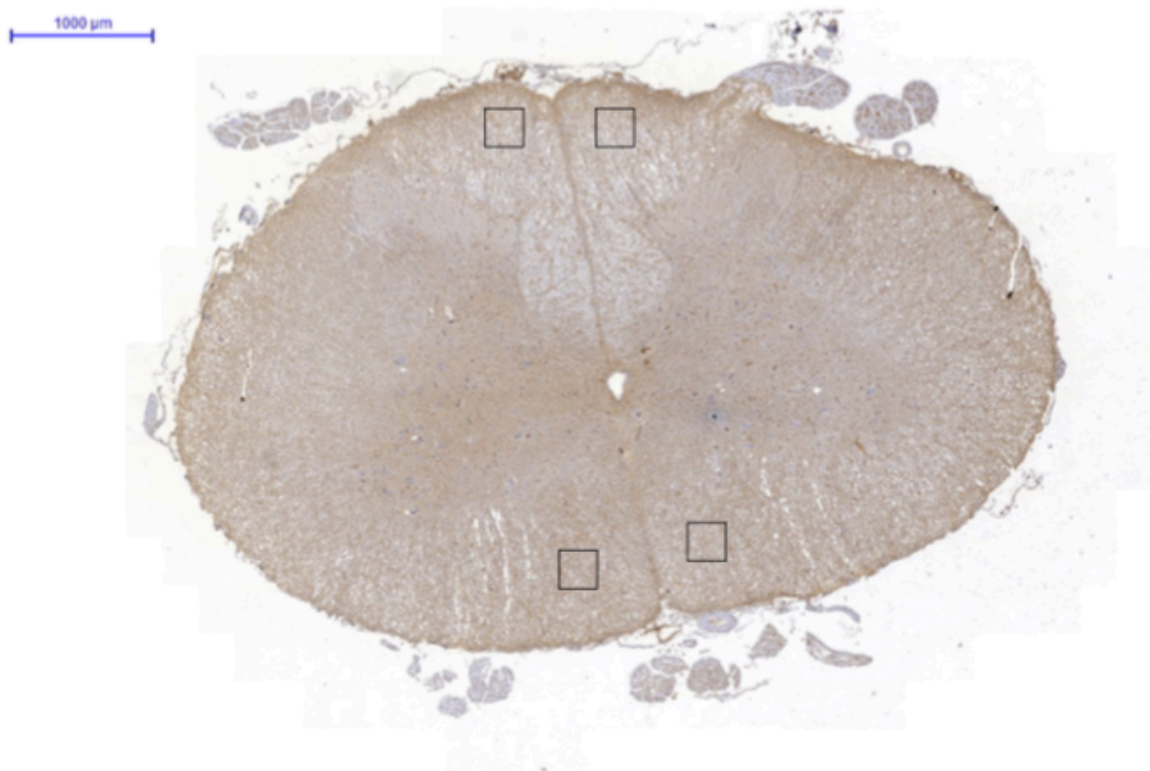
A Figura 1 resume o fluxo desenvolvido na avaliação histológica.

A avaliação dos resultados histológicos foi realizada por três pesquisadores envolvidos no estudo (MEAM, EMG, DM).



**Figura 1** – Organograma da avaliação histológica. Fonte: elaborado pela autora.

Para análise aprofundada da celularidade medular, foi estimada a porcentagem de células a partir da avaliação da área imuno-histologicamente marcada pelo GFAP nos cornos dorsais e ventrais da medula (Figura 2). Para tanto, os cortes histológicos corados pelo GFAP, após terem sido fotografados em resolução 1090 x 650 tipo JPG, 96 dpi, 24 bits de cor, captada em microscópio Panoramic MIDI 3DHISTECH, sob objetiva 200x foram submetidos ao processamento digital segundo algoritmo que se segue (Quadro 1), empregando o software Image J 1.46 e o *plugin* “Color Deconvolution”.



**Figura 2** – Segmento das regiões anterior e posterior da medula espinal. GFAP 40x.  
Exemplo de área utilizada para estimar o percentual de células marcadas.

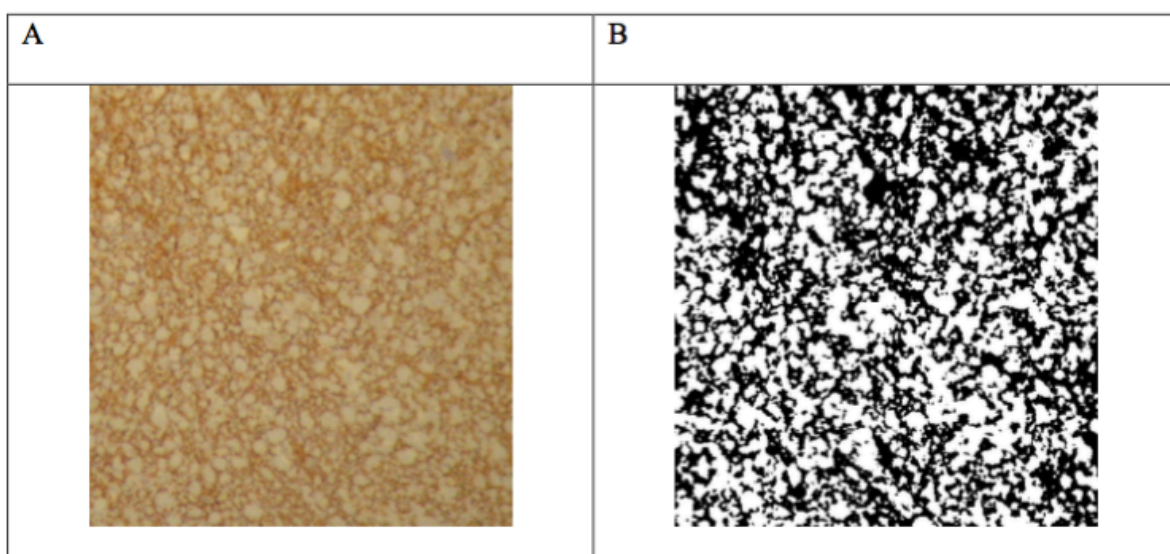
**Quadro 1** – Algoritmo de processamento das imagens para quantificação imunohistoquímica

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

As imagens foram, inicialmente, separadas por seus vetores componentes da hematoxilina e DAB pelo *plugin* "Color Deconvolution" (H-DAB). Em

seguida, foi selecionada uma área retangular do tecido e realizado o aumento do contraste, de forma padronizada, para a binarização da imagem.

Foi avaliado o percentual da área da imagem binarizada equivalente aos pixels do tecido marcado pelo DAB (Figura 3), e comparadas as amostras entre os grupos.<sup>39-41</sup>



**Figura 3** – A. Área selecionada do tecido neural. B. Área binarizada após o processamento da imagem (resultando em 45% do tecido marcado).

#### 4.6 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, estima-se que serão 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 e ao volume da solução administrada no espaço subaracnoideo, foi realizado o test t Student (resultados expressos em média e desvio-padrão) e, para comparar os resultados dos percentuais das marcações histológicas das células pelo método



do GFAP, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (resultados apresentados em mediana e 1º e 3º quartis) sendo considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## ***RESULTADOS***

## 5. RESULTADOS

Nenhum animal de G1 ou G2 foi excluído da pesquisa por dificuldade na realização da punção subaracnoidea.

No animal 13 de G2 foi necessária a retirada da agulha após a passagem pela pele, porque apresentou hiperextensão das patas posteriores com o estímulo. Neste animal foi administrada segunda dose de anestésico intravenoso para possibilitar a abordagem do espaço subaracnoideo.

Os grupos foram homogêneos quanto ao peso ( $p=0,69$ ) e ao volume da solução introduzida no espaço subaracnoideo ( $p=0,44$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Peso e volume da solução administrada nos dois grupos experimentais. (Resultados expressos em média e desvio-padrão).

	G1	G2	p
Peso (g)	3380 ± 239	3790 ± 282	0,69
Volume de solução (mL)	0,35 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,44

Nenhum animal de ambos os grupos manifestou alterações de motricidade e sensibilidade durante o período de cativeiro.

Os animais do grupo G1 não apresentaram alterações histológicas no tecido nervoso, nos vasos sanguíneos e nas meninges à microscopia óptica (Figuras 4 e 5).

Em treze coelhos do G2 foram observadas alterações histológicas. Houve infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focal (5%) nos vasos das meninges (em oito coelhos, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular nos vasos da pia-máter e, em cinco animais, o infiltrado inflamatório perivascular comprometeu a pia-máter e aracnoide) (Figuras 6 a 13).

Em nove animais, o infiltrado inflamatório linfoplasmocitário também foi encontrado nas meninges (cinco exclusivamente na pia-máter e quatro na pia-máter e aracnoide) (Figuras 11 e 13).

Em cinco coelhos, as meninges apresentaram-se com características normais.

Em dois animais, foi constatado infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intraparenquimatoso (Figuras 7 e 14). Em dois coelhos, observou-se infiltrado inflamatório perivascular nos vasos do parênquima do tecido nervoso (Figuras 12 a 14).

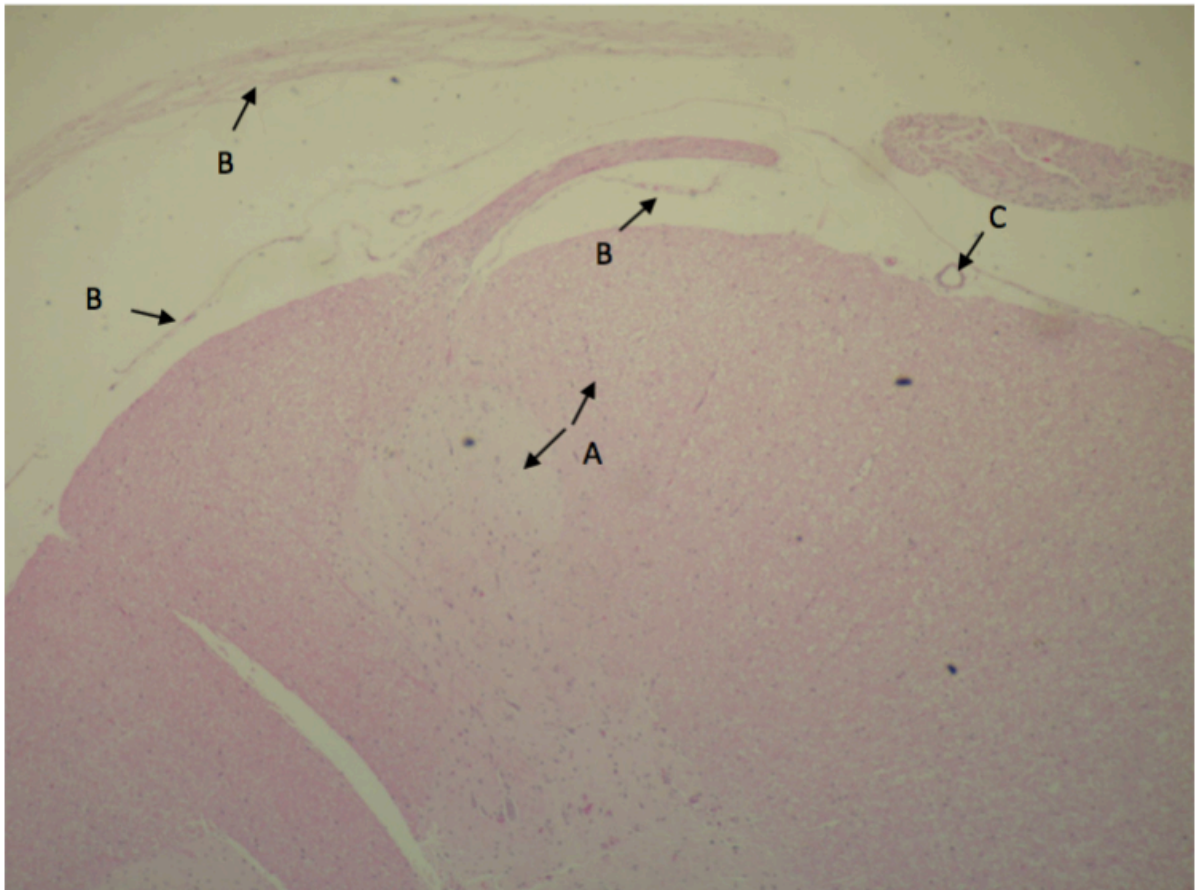
Os resultados histológicos dos animais de G2 estão resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2** – Resultados histológicos do tecido nervoso, dos vasos sanguíneos e das meninges dos animais pertencentes ao G2.

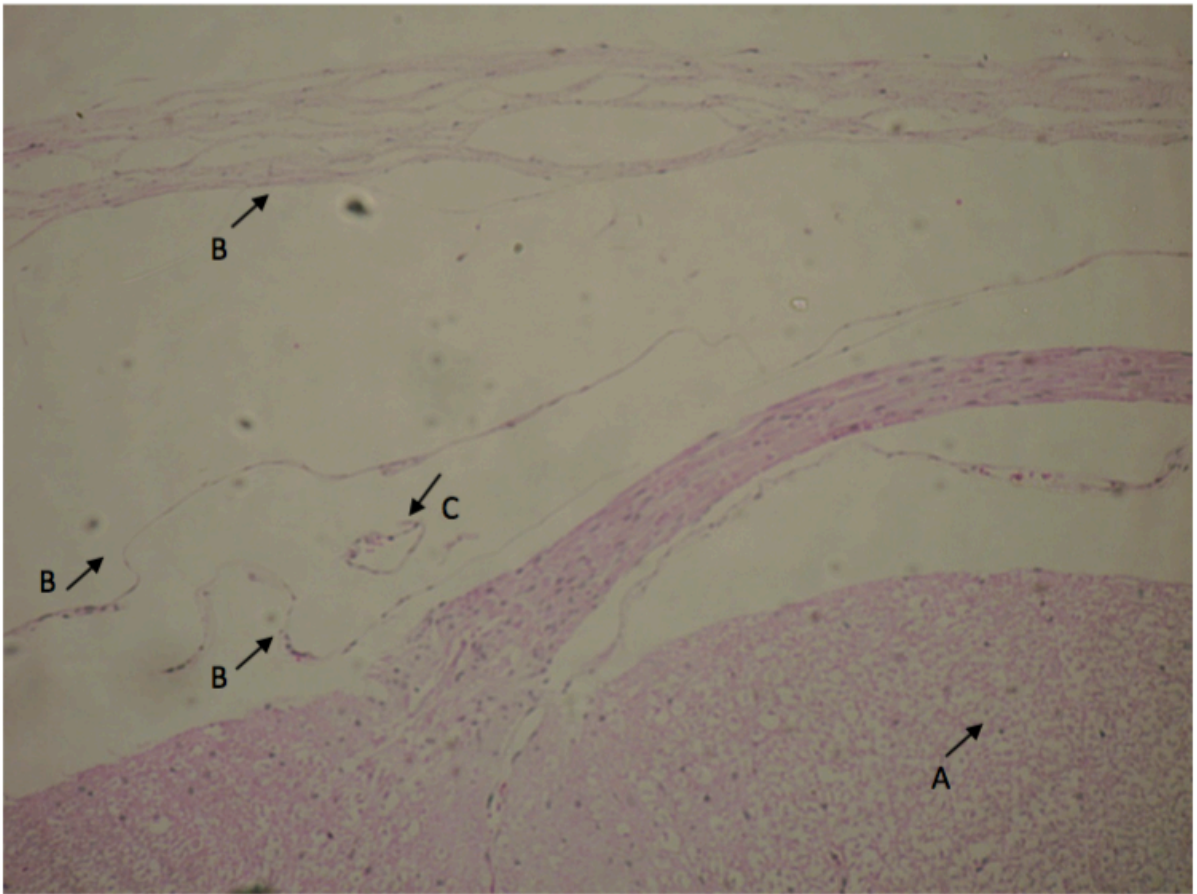
coelho	tecido nervoso	vasos sanguíneos meníngeos	meninges
1	normal	normal	normal
2	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intraparenquimatoso (++, < 5%), região central e perivascular intraparenquimatoso	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter (++, < 5%), região posterior	normal
3	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intraparenquimatoso (++, < 5%), região posterior, substância branca	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (++, < 5%), região posterior	normal
4	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter (++, < 5%), região posterior	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter (++, < 5%), região posterior

5	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter (+, < 5%), região posterior, lateral e posterior	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter (+), região posterior, lateral e posterior
6	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter (1/2 +, < 5%), região posterior	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter (1/2 +, < 5%), região posterior
7	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter (1/2 +, < 5%), região posterior	normal
8	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter (+, < 5%), região posterior	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter (+, < 5%), região posterior
9	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (++) e no espaço de Virchow Robin, região posterior	normal
10	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (+, < 5%), região posterior	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter e aracnoide (+, < 5%), região posterior
11	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (++) , regiões posterior e lateral	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter e aracnoide (++, < 5%), regiões posterior e lateral
12	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular no parênquima nervoso	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (+++), regiões posterior, lateral e anterior	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter e aracnoide (+++), regiões posterior, lateral e anterior

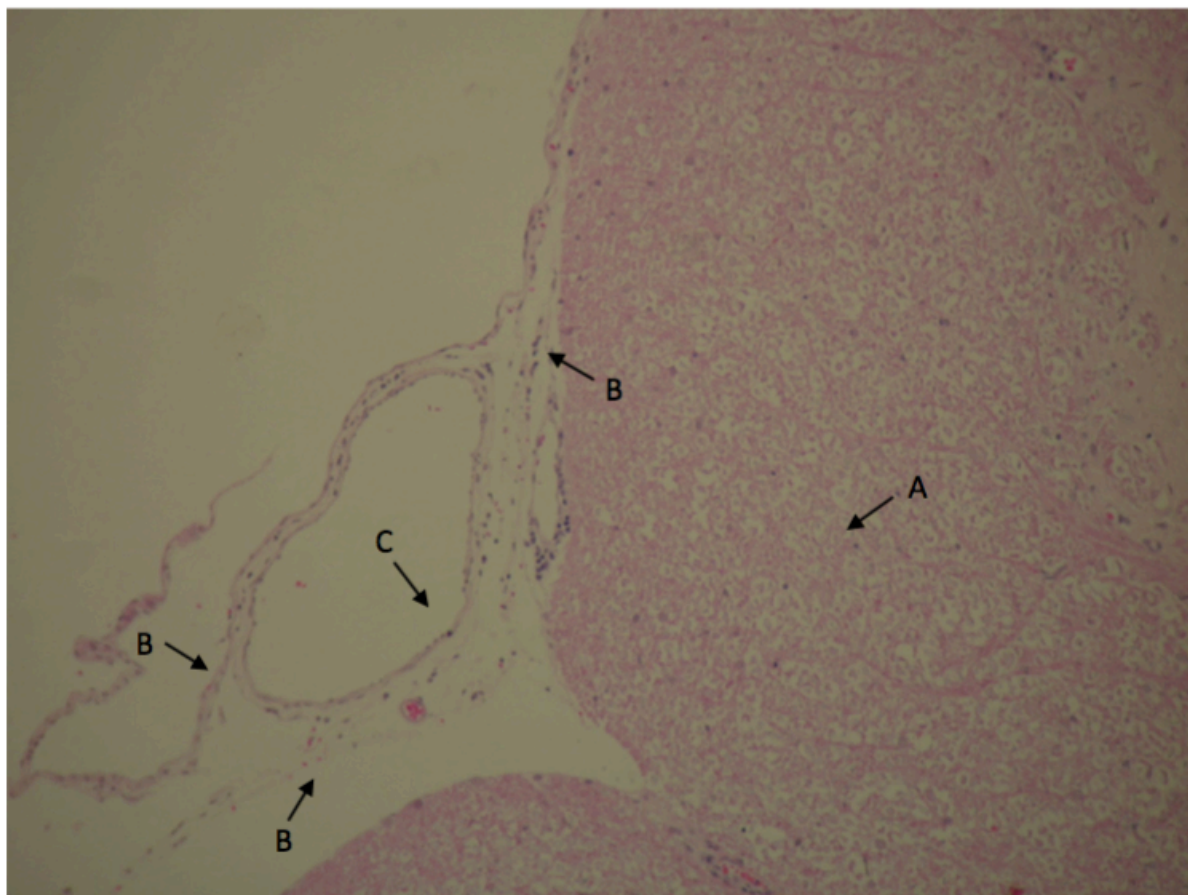
13	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter (+, < 5%), região posterior	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter (+, < 5%), região posterior
14	normal	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter (+, < 5%), região posterior	infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter (+, < 5%), região posterior



**Figura 4** – Tecido nervoso (A), meninges (B) e vasos sanguíneos (C) normais em animal de G1. HE 40x.

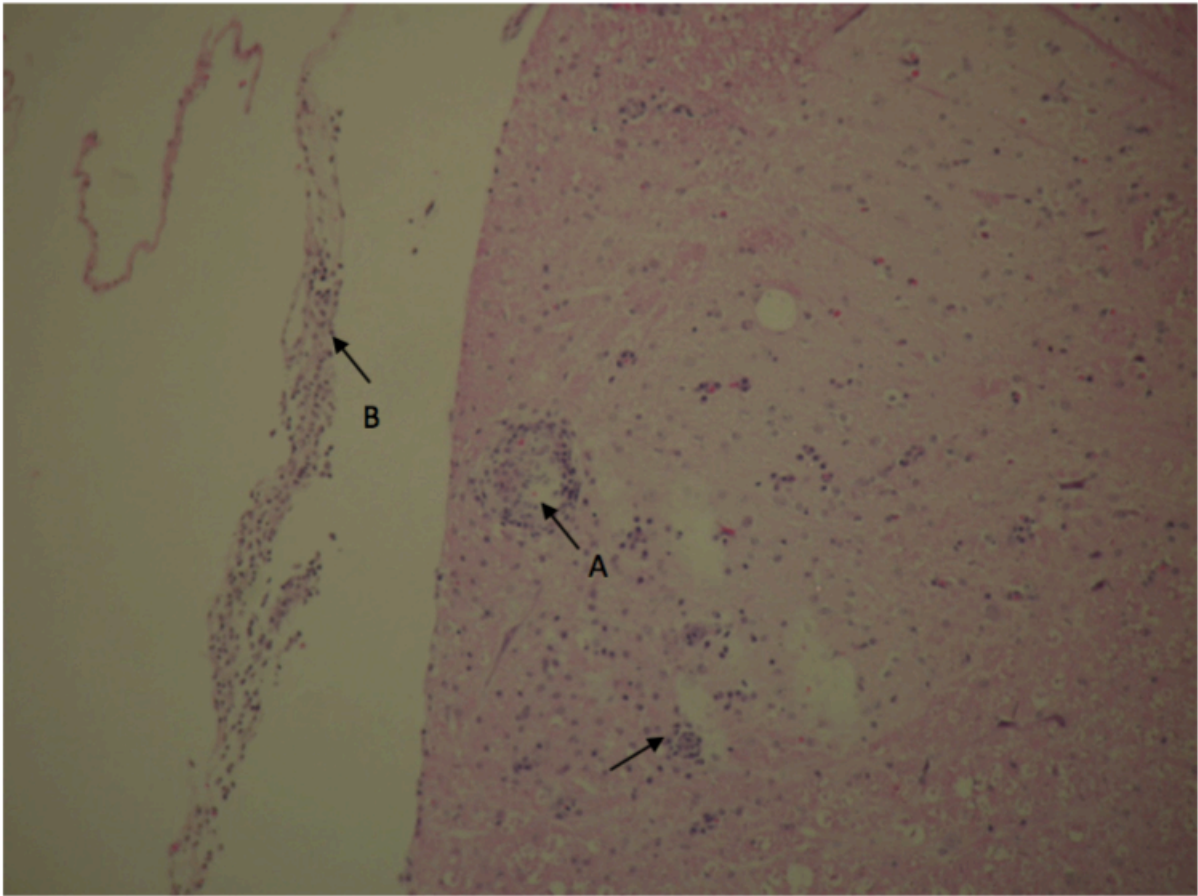


**Figura 5** – Tecido nervoso (A), meninges (B) e vasos sanguíneos (C) normais em animal de G1. HE 100x.

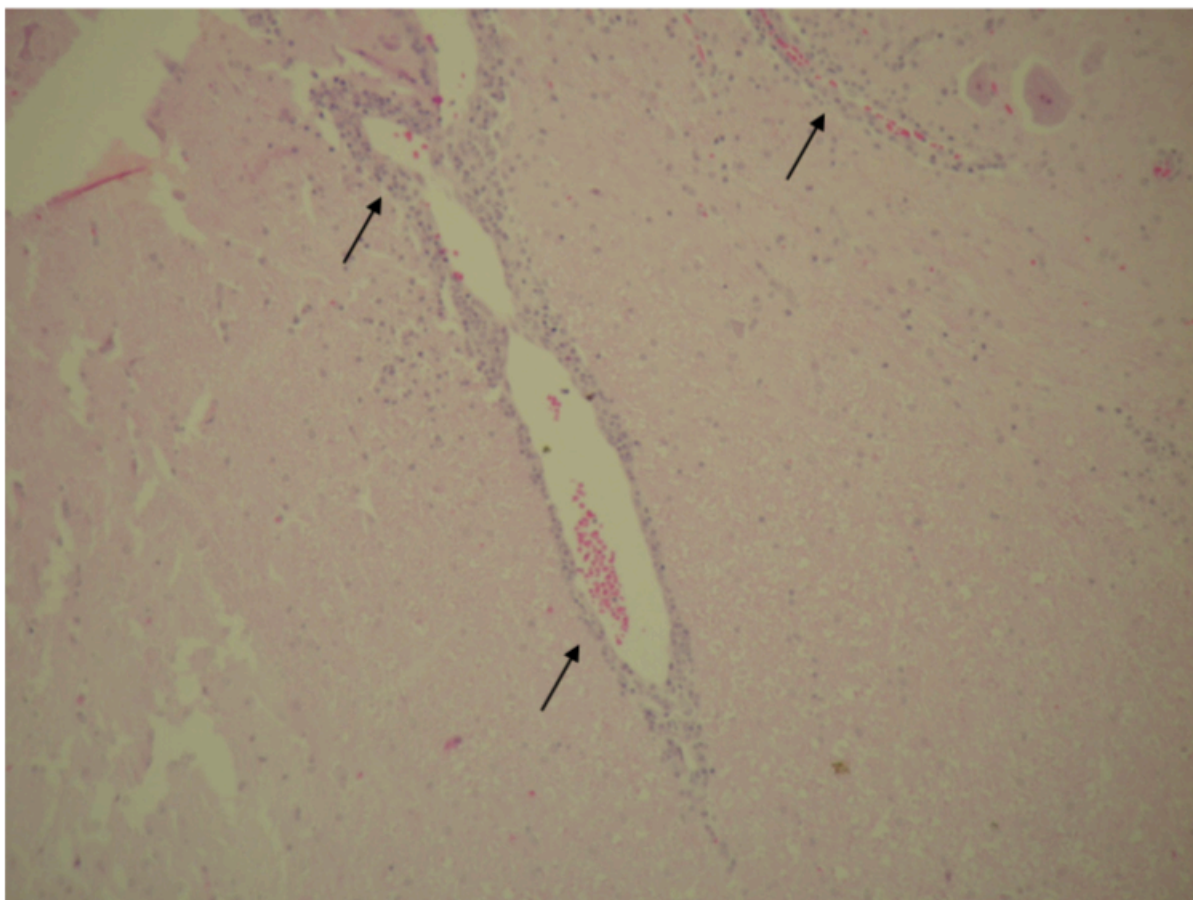


**Figura 6** – Tecido nervoso normal (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B,C) em animal de G2 (coelho 2). HE 100x.

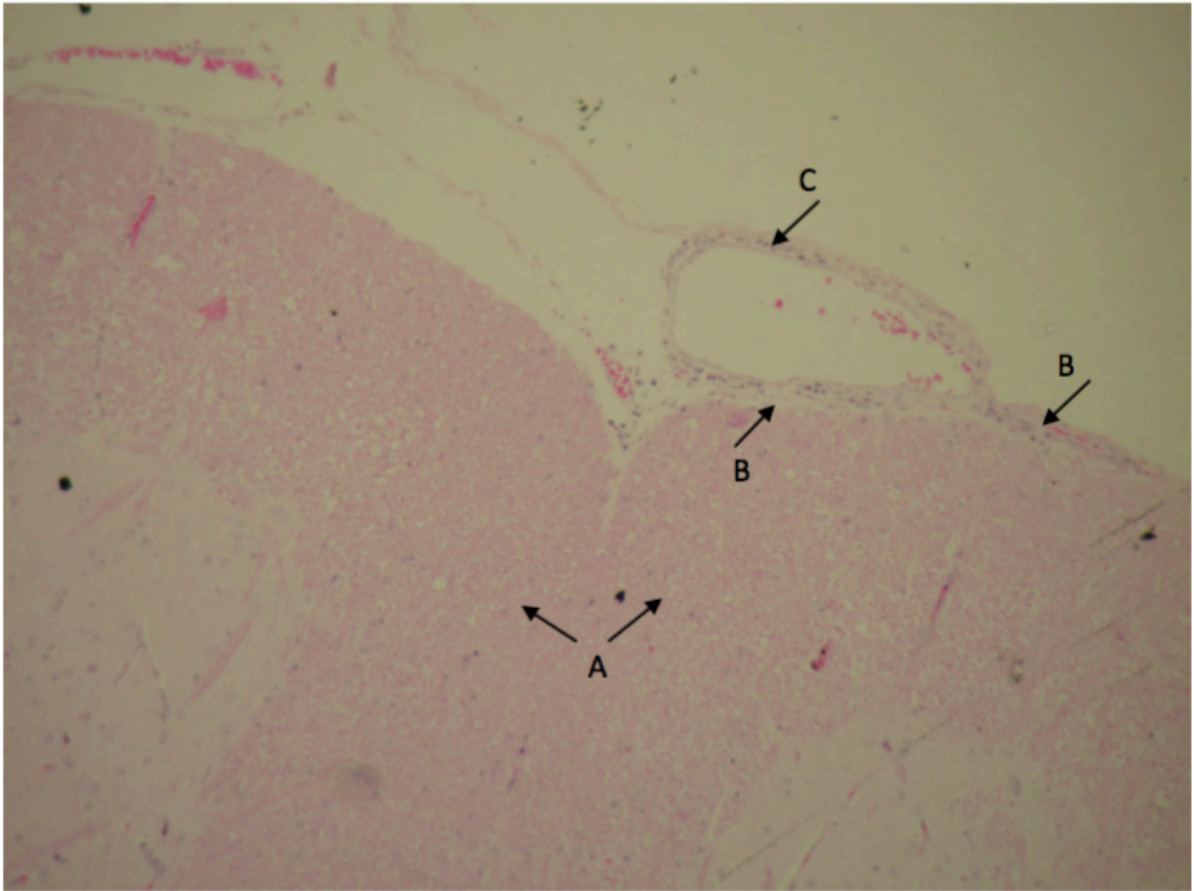




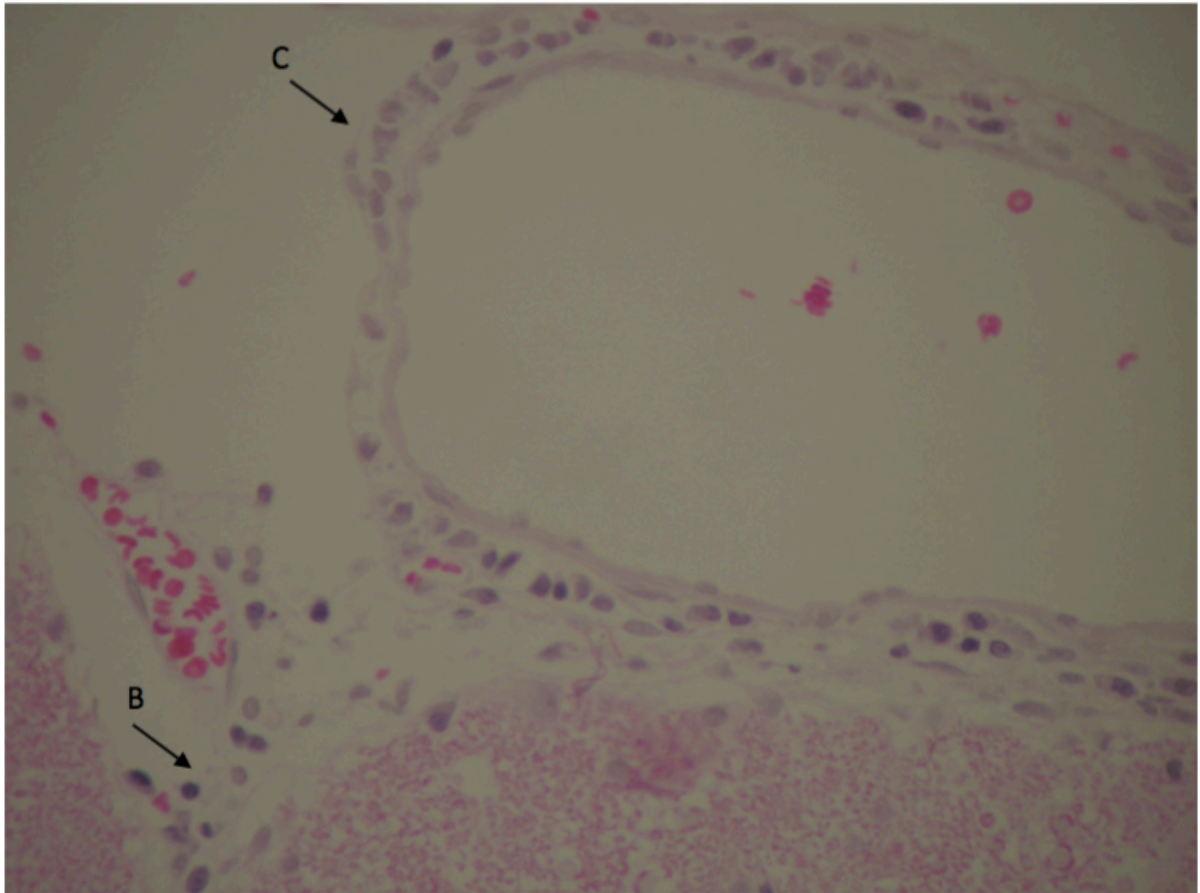
**Figura 7** – Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intraparenquimatoso (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B) em animal de G2 (coelho 3). HE 100x.



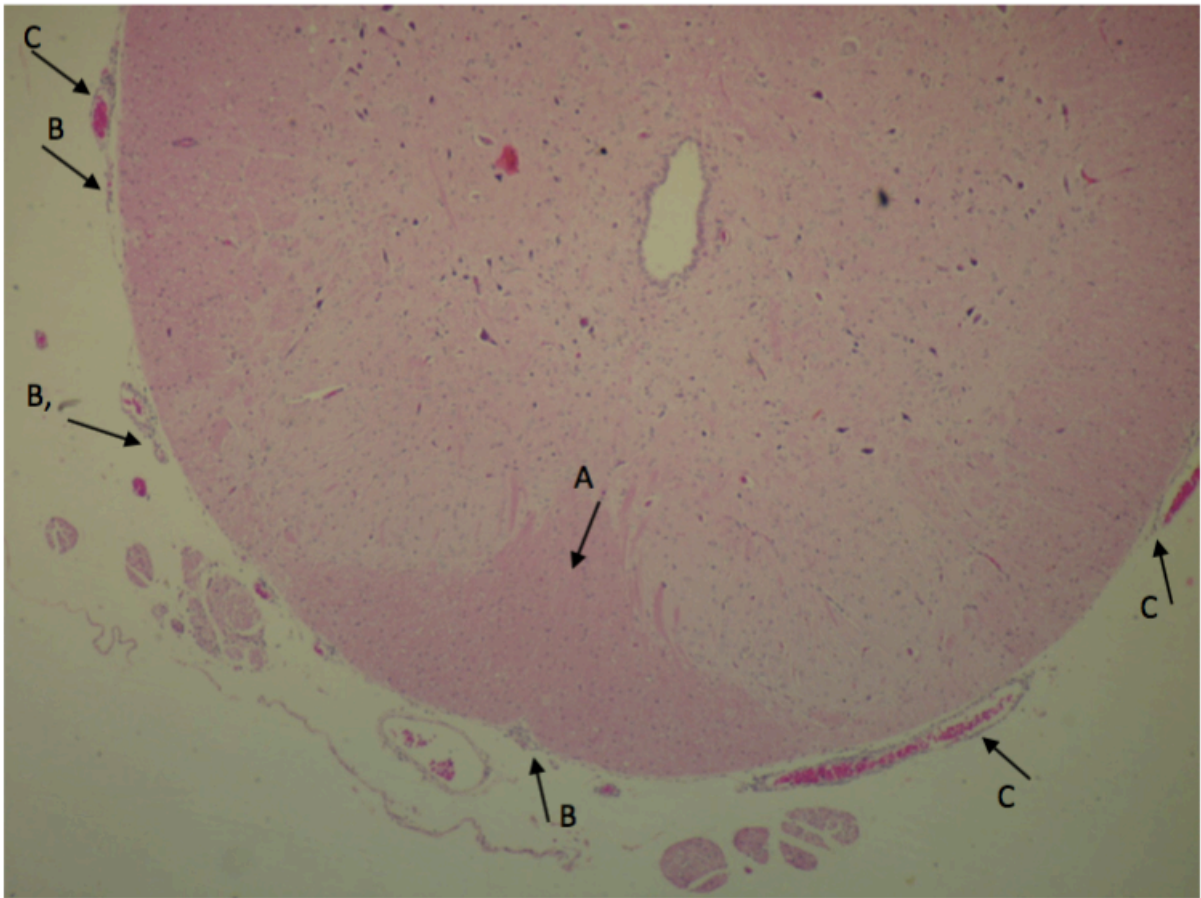
**Figura 8** – Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter. Espaço de Virchow-Robin em animal de G2 (coelho 9). HE 100x.



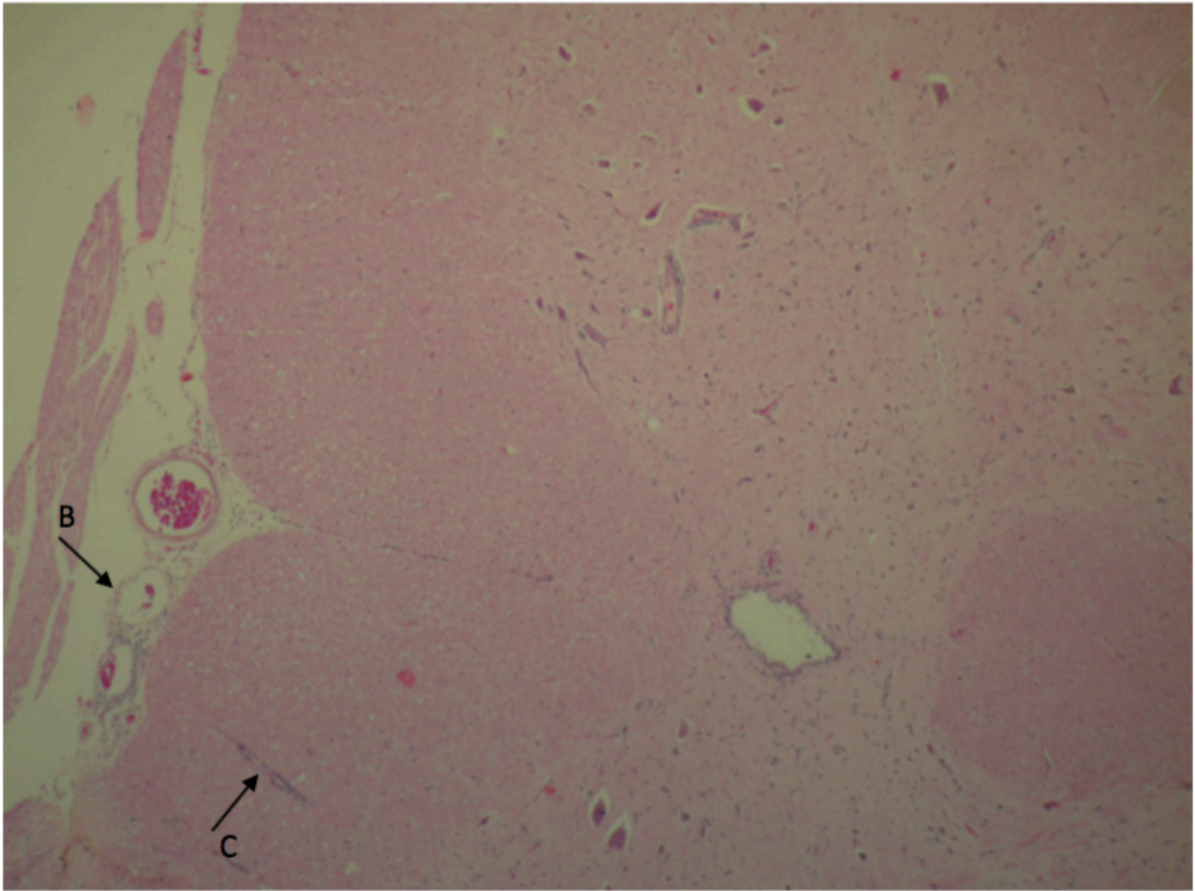
**Figura 9** – Tecido nervoso normal (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B,C) em animal de G2 (coelho 9). HE 100x.



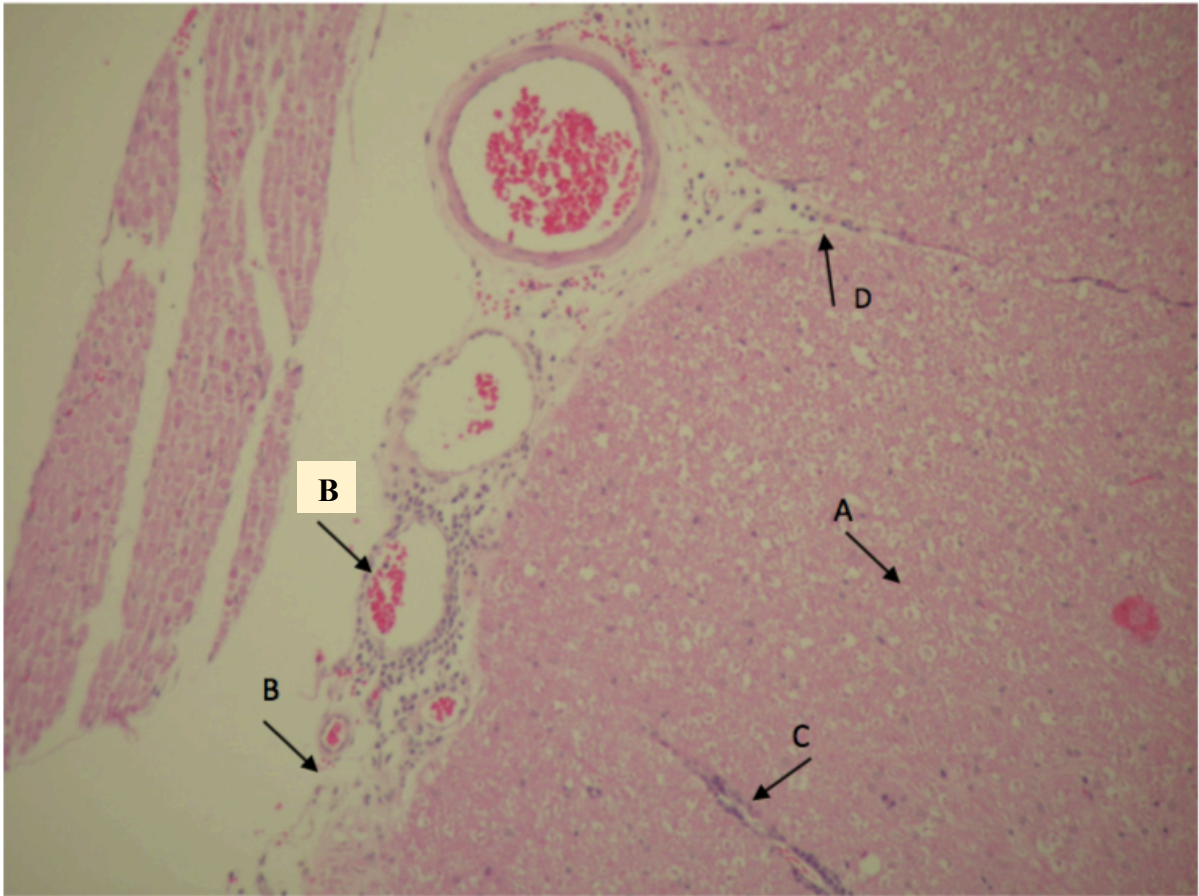
**Figura 10** – Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B,C) em animal de G2 (coelho 9). HE 400x.



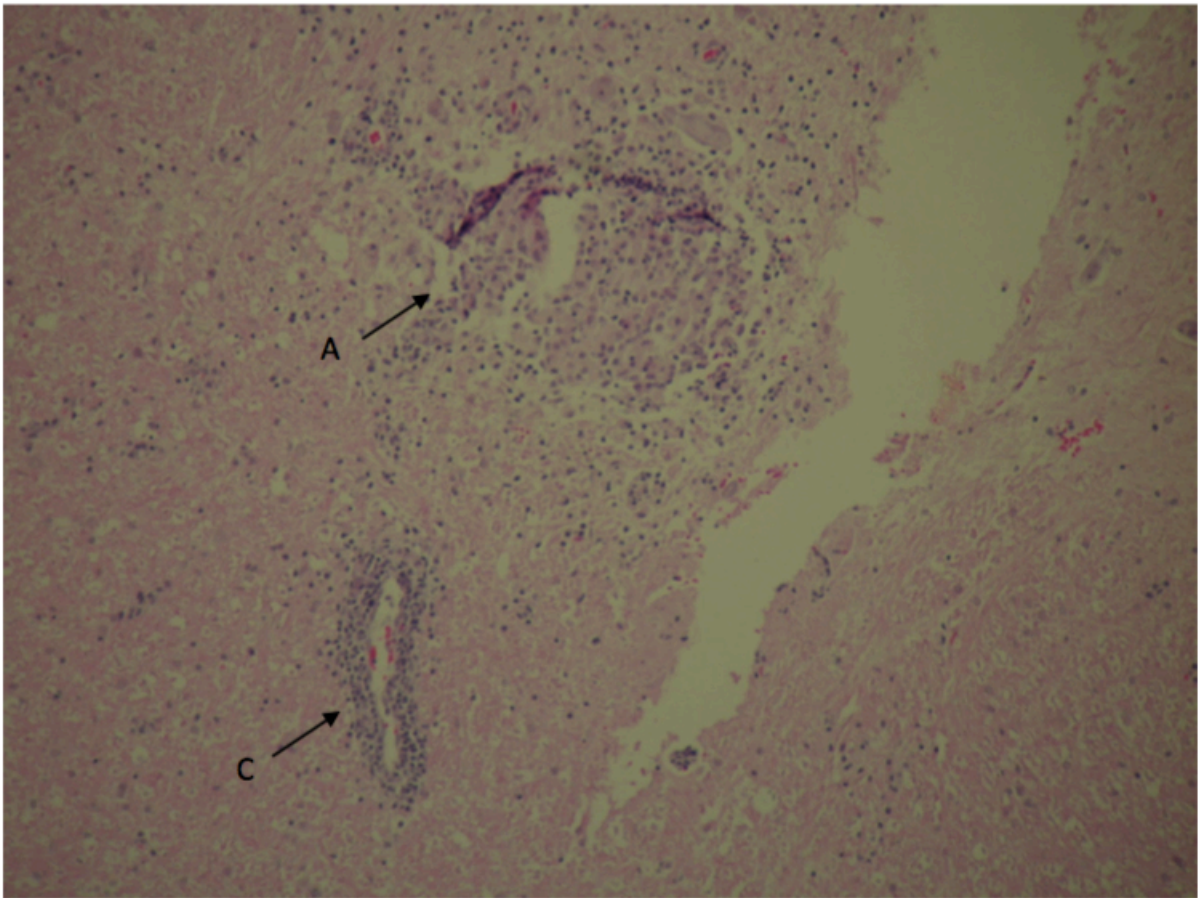
**Figura 11** – Tecido nervoso normal (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter e aracnoide (B), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular nos vasos da pia-máter e aracnoide (C) em animal de G2 (coelho 12). HE 40x.



**Figura 12** – Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular intraparenquimatoso (C) em animal de G2 (coelho 12). HE 100x.



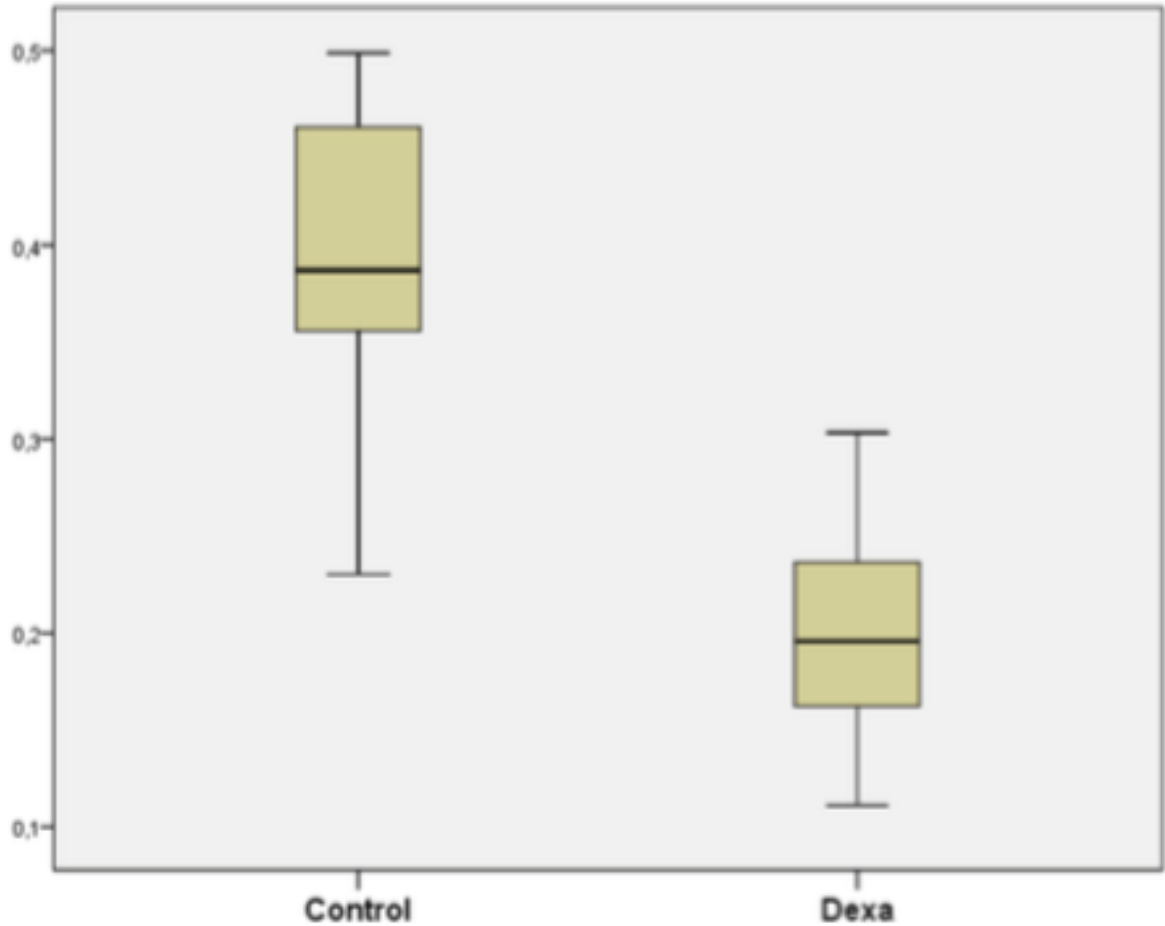
**Figura 13** – Tecido nervoso normal (A), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular na pia-máter e aracnoide (B), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular intraparenquimatoso (C), infiltrado inflamatório linfoplasmocitário na pia-máter (D), em animal de G2 (coelho 12). HE 400x.



**Figura 14** – Infiltrado inflamatório linfoplasmocitário intraparenquimatoso (A) e nos vasos intraparenquimatosos (C) em animal de G2 (coelho 2). HE 400x.



O percentual de tecido marcado pelo GFAP no grupo G1 foi de  $48 \pm 7\%$  e no grupo G2  $20 \pm 5\%$ , resultado estatisticamente significativo ( $p < 0,049$ ) (Figura 15).



**Figura 15** – *Box-plot* da mediana e 1º e 3º quartis do percentual de células marcadas pelo GFAP nos grupos estudados.

## ***DISCUSSÃO***

## 6. DISCUSSÃO

A injeção peridural de esteroides é o procedimento mais utilizado no mundo para o controle da dor e, apesar de grande número de pesquisas publicadas na literatura sobre o assunto, há controvérsias em relação à sua eficácia e segurança.<sup>12</sup>

A injeção subaracnoidea de substâncias tóxicas ao tecido nervoso pode desencadear aracnoidite adesiva se produzir irritação química ou inflamação. Foi aventada, então, a hipótese de que a injeção não intencional de corticosteroides no espaço subaracnoideo pudesse causar aracnoidite adesiva e meningite asséptica em alguns indivíduos. Contudo, essa associação ainda não foi totalmente esclarecida.<sup>12</sup>

A aracnoidite adesiva inicia-se como processo inflamatório da pia-máter e da aracnoide, associado a edema e hiperemia das raízes nervosas. Com a evolução da doença, faixas de colágeno começam a se formar entre a pia-máter, a aracnoide e as raízes nervosas, culminando com a aderência entre estas estruturas. Nesta fase o edema das raízes começa a diminuir.<sup>42,43</sup>

A aracnoidite adesiva crônica é a resolução do processo inflamatório. Ocorre depósito denso de colágeno entre as raízes nervosas e as meninges, com encapsulamento de raízes, levando à atrofia das mesmas e ao comprometimento dos vasos sanguíneos.<sup>44</sup> Alterações nas arteríolas, caracterizadas por inflamação e espessamento hialino, foram manifestações iniciais da aracnoidite adesiva desencadeada por contaminação da solução do anestésico local por antisséptico em modelo experimental.<sup>45</sup>

Aracnoidite é mais frequentemente diagnosticada em pacientes que já apresentaram múltiplas cirurgias de coluna, de modo que a identificação do fator causador é complexa. Trata-se de condição incomum, cujos sintomas dificilmente podem ser separados daqueles que a princípio levaram muitos pacientes a receberem injeções peridurais de corticosteroides.<sup>12</sup>

Preocupações quanto ao potencial neurotóxico das suspensões de corticosteroides surgiram durante o tratamento de casos avançados de esclerose múltipla com acetato de metilprednisolona subaracnoideo, pois, em um grupo de 23

pacientes, dois desenvolveram aracnoidite adesiva após repetidas injeções. Um caso de aracnoidite documentada por mielografia também foi reportado após injeção subaracnoidea inadvertida deste fármaco para dor lombar.<sup>12</sup>

No presente estudo, 92% dos animais apresentaram reação inflamatória nos tecidos do neuroeixo em resposta à injeção da dexametasona no espaço subaracnoideo. As alterações foram primariamente perivasculares nos vasos da pia-máter e depois se distribuíram pela pia-máter e aracnoide, o que poderia evoluir para quadro de aracnoidite adesiva. Essas alterações observadas foram desencadeadas por alguma das substâncias contidas na solução de dexametasona.

Quando um fármaco produz toxicidade, nem sempre é fácil determinar qual dos componentes da sua formulação é o agente causador.<sup>12</sup> A solução injetável de dexametasona utilizada nesta pesquisa possui, em sua apresentação comercial, fosfato dissódico de dexametasona 2,19 mg (equivalente a 2 mg de dexametasona ácido fosfórico) e, como excipientes, citrato de sódio, edetato dissódico, metilparabeno, propilparabeno, bissulfito de sódio e água.

O metilparabeno é o metil éster do ácido p-hydroxibenzóico produzido pela esterificação do metanol. É o preservativo contido nos anestésicos locais.<sup>46</sup> Já foi descrito que neurotoxicidade seria um possível efeito adverso do metilparabeno, entretanto não foram encontradas evidências nos trabalhos publicados na literatura de que a substância fosse de fato tóxica.<sup>47</sup>

Em nervos de ratos e ovelhas expostos ao metilparabeno contido na preparação de neostigmine não se observou alterações histológicas após a solução ter sido injetada no espaço subaracnoideo.<sup>47</sup> Por outro lado, concentrações elevadas desta substância (acima de 0,1%) causaram supressão do potencial de ação do nervo vago isolado de coelho, potencial que foi restabelecido após os nervos terem sido lavados. Nestes nervos, depois da recuperação do potencial de ação, não foram constatadas alterações histológicas à microscopia óptica e eletrônica.<sup>48</sup>

Outras substâncias presentes em formulações de corticosteroides também foram associadas a possível neurotoxicidade, como o polietileno-glicol, o benzil álcool e o cloreto de benzalcônio, porém com resultados conflitantes na literatura.<sup>12,49</sup>

A despeito de muitos pesquisadores atribuírem aos preservativos contidos nas soluções de esteroides a responsabilidade pelos casos de neurotoxicidade, estudo em que se realizou múltiplas injeções subaracnoideas de acetato de metilprednisolona com diminuição de preservativos em cães revelou inflamação meníngea dose-dependente. Isso leva à hipótese de que a própria metilprednisolona atuaria como fator desencadeador da resposta inflamatória.<sup>23</sup> Os autores deste trabalho acreditam que a natureza particulada da metilprednisolona possa ser uma das causas da inflamação. Eles também especulam que a presença de partículas no espaço subaracnoideo pode promover a migração de células inflamatórias e questionam se as formulações particuladas deveriam ser contraindicadas por esta via.<sup>23</sup>

Nesse contexto, o uso da solução de dexametasona, devido ao pequeno tamanho de suas partículas (5µm) e ao fato de não formarem agregados, apresentaria possível vantagem em relação aos demais corticosteroides no neuroeixo.<sup>50</sup>

Relatos de complicações catastróficas incluindo cegueira, paralisia e morte após injeção de corticosteroides peridurais, na maioria, ocorreram com a utilização de soluções particuladas durante o bloqueio cervical transforaminal. Esses casos levaram investigadores, agências reguladoras e sociedades científicas a recomendarem, entre outros cuidados, o uso de corticosteroides não particulados na coluna cervical. Conquanto mais raros, casos com sérias lesões neurológicas associadas ao uso de corticosteroides peridurais particulados também ocorreram em injeções no nível torácico, lombar e sacral.<sup>10</sup>

As complicações acima citadas após as injeções peridurais de corticoides particulados podem ser resultado, entre outros, de lesões neurológicas por isquemia. Acredita-se que as partículas da solução seriam grandes o suficiente para ocluir arteríolas e para sofrerem embolização distais a vasos colaterais quando há injeção intra-arterial.<sup>10</sup>

Estudos em porcos<sup>51</sup> e em ratos<sup>52</sup> mostraram, respectivamente, que a injeção de metilprednisolona, corticosteroide particulado, dentro da artéria vertebral<sup>51</sup> e da carótida interna<sup>52</sup> pode levar a graves lesões neurológicas, que não ocorreram após a injeção de dexametasona nesses experimentos. Apesar desses achados, há relato na literatura de infarto medular após bloqueio peridural transforaminal ao nível de L4

com dexametasona. Portanto, outros motivos não relacionados à natureza particulada dos corticosteroides injetados no espaço peridural devem estar envolvidos na patogênese das complicações observadas, como vasoespasma induzido pela ponta da agulha de bloqueio e formação de trombo na artéria espinal anterior.<sup>53</sup> Além disso, ainda que a dexametasona seja não particulada, foi verificado que a mistura com ropivacaína, anestésico local amplamente utilizado, leva à formação de cristais, ou seja, essa associação possui o mesmo risco de embolização e dano nervoso que as suspensões de corticosteroides.<sup>54</sup>

Os resultados observados no presente estudo foram, em alguns aspectos, similares ao encontrados em cães que receberam, pela via subaracnoidea em injeção única, a betametasona e a metilprednisolona.<sup>17,28</sup> Nestes animais, a aracnoidite adesiva iniciou-se a partir de reação inflamatória na área perivascular dos vasos da pia-máter e aracnoide, porém, nos cães, a toxicidade do tecido nervoso ocorreu em regiões superficiais da medula, próximas aos focos de aderências entre as meninges, podendo ser resultantes de diminuição do fluxo sanguíneo local. Já com a dexametasona, as alterações do tecido nervoso apareceram em áreas mais profundas, próximas aos vasos sanguíneos.

É possível que o caráter não particulado da dexametasona, por facilitar sua dispersão no neuroeixo, contribua para o aparecimento de reação inflamatória no interior dos vasos do parênquima e ao redor dos prolongamentos da pia-máter que acompanham estes vasos, conforme visto nesta pesquisa, porém essa hipótese precisaria ser melhor pesquisada.

Alguns autores aventaram, ainda, a hipótese de que aumentos agudos no volume do líquido poderiam, por elevar a pressão líquórica, comprometer o fluxo sanguíneo e causar isquemia medular, resultando em lesões neurológicas.<sup>55</sup> Para avaliar essa possibilidade, neste estudo, o grupo controle (G1) recebeu injeção de salina 0,9% em volume correspondente ao injetado de dexametasona. Este grupo também teve o objetivo de excluir eventual injeção neural da solução, visto que 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.<sup>56,57</sup> Como não houve alterações histológicas nos animais do grupo G1, pode-

se concluir que estes mecanismos não determinaram lesão, apesar de o espaço subaracnoideo dos coelhos ser pequeno.<sup>58</sup>

Também foi verificado no presente estudo que, embora a injeção subaracnoidea de dexametasona tenha induzido inflamação nos coelhos do grupo 2, nesses animais houve menor porcentagem de células marcadas pelo GFAP. Na realidade, considerando-se que astrócitos sofrem hipertrofia em resposta a uma variedade de condições, incluindo insultos físicos e químicos, doenças neurodegenerativas e envelhecimento<sup>59</sup>, o contrário seria esperado.

Inicialmente acreditava-se que a ativação astrocitária e o aumento da expressão de GFAP estivessem associados à exacerbação da degeneração neuronal, mas trabalhos recentes mostraram que existem diferentes subtipos de astrócitos reativos, com diferentes fenótipos, ou seja, alguns estão associados a morte celular enquanto outros à reparação tecidual. Isso significa que, ainda que tenha havido redução da ativação astrocitária no grupo submetido a injeção com dexametasona, não é possível concluir que esse efeito seria benéfico ao tecido lesado.<sup>36</sup>

Os mecanismos que controlam essas diferentes ações dos astrócitos ativados permanecem desconhecidos.<sup>36</sup> Há estudos publicados na literatura que especulam se as respostas astrocitárias a lesões cerebrais poderiam ser reguladas por glicocorticoides. Em ratos sadios que receberam corticosterona foi verificada diminuição na expressão de GFAP. Nesse mesmo experimento, também foi constatado que em ratos adrenalectomizados ocorria aumento da expressão de GFAP, enquanto que em ratos adrenalectomizados que receberam corticosterona exógena foi verificada diminuição da concentração de GFAP. Em contraste, o uso de corticosterona em outro grupo de ratos nos quais foi induzida lesão cerebral não atenuou o aumento da concentração de GFAP nesse trabalho.<sup>36</sup>

Além disso, a análise da celularidade medular foi estimada a partir da avaliação da área imuno-histologicamente marcada pelo GFAP apenas nos cornos dorsais e ventrais da medula, o que significa que é possível que áreas com lesão induzida pela dexametasona não tenham sido incluídas nessa análise.

Diante do exposto, acreditamos que seja necessário realizar novos estudos para melhor elucidação dos efeitos que a solução de dexametasona exerce sobre o tecido nervoso espinal, quando introduzida no espaço subaracnoideo.

### 6.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O coelho possui pequena quantidade de líquido e, quando um fármaco é introduzido no espaço subaracnoideo, sofre diluição em menor proporção do que quando administrado em animais de maior porte ou no ser humano. Tal fato pode exacerbar as possíveis alterações desencadeadas pela substância estudada, haja vista que concentrações mais elevadas entram em contato com o tecido nervoso e as meninges.

Como o coelho é animal que não expressa bem suas reações em vigência de dor ou outra sensação desagradável, só é possível detectar clinicamente alterações neurológicas quando as lesões histológicas do tecido nervoso e das meninges são mais extensas. É possível que este seja um dos fatores responsáveis por não ter sido possível detectar alterações clínicas no exame neurológico durante o período de cativeiro.

Apesar de o intervalo de tempo de cativeiro de 21 dias ter sido suficiente para desencadear quadro de aracnoidite em cães, talvez, se os coelhos tivessem permanecido mais tempo em cativeiro, as alterações histológicas das meninges tivessem sido mais exuberantes.<sup>17,28,45</sup>



## **CONCLUSÃO**

## **7. CONCLUSÃO**

Neste modelo experimental em coelhos, a solução de dexametasona desencadeou alterações histológicas no tecido nervoso da medula espinal e, principalmente, nas meninges.

## ***REFERÊNCIAS***

## REFERÊNCIAS

1. Liu S, Carpenter RL, Neal JM. Epidural anesthesia and analgesia. Their role in postoperative outcome. *Anesthesiology*. 1995;82(6):1474-506.
2. Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth*. 2000;85(1):109-17.
3. Kehlet H. The stress response to surgery: release mechanisms and the modifying effect of pain relief. *Acta Chir Scand Suppl*. 1989;550:22-8.
4. Kehlet H. The surgical stress response: should it be prevented? *Can J Surg*. 1991;34(6):565-7.
5. Khafagy HF, Refaat AI, El-Sabae HH, Youssif MA. Efficacy of epidural dexamethasone versus fentanyl on postoperative analgesia. *J Anesth*. 2010;24(4):531-6.
6. Rosenquist R. Complications associated with chronic opioid therapy. In: Neal MN, Rathmell JP. *Complications in regional anesthesia and pain medicine*. 1st ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 314-29.
7. Jehle AW. Comment agit la prednisone? Pourquoi pas toujours? *Forum Med Suisse*. 2011;11(27):473-7.
8. Biddie SC, Conway-Campbell BL, Lightman SL. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51(3):403-12.
9. Balagué F, Pigué V, Dudler J. Steroids for LBP - from rationale to inconvenient truth. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:w13566.
10. MacMahon PJ, Huang AJ, Palmer WE. Spine Injectables: What Is the Safest Cocktail? *AJR Am J Roentgenol*. 2016;207(3):526-33.
11. Stahn C, Buttgerit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(10):525-33.
12. Cohen SP, Bicket MC, Jamison D, Wilkinson I, Rathmell JP. Epidural steroids: a comprehensive, evidence-based review. *Reg Anesth Pain Med*. 2013;38(3):175-200.
13. Choi S, Rodseth R, McCartney CJ. Effects of dexamethasone as a local anaesthetic adjuvant for brachial plexus block: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Br J Anaesth*. 2014;112(3):427-39.
14. Desmet M, Braems H, Reynvoet M, Plasschaert S, Van Cauwelaert J, Pottel H, et al. I.V. and perineural dexamethasone are equivalent in increasing the analgesic duration of a single-shot interscalene block with ropivacaine for

- shoulder surgery: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Br J Anaesth.* 2013;111(3):445-52.
15. Rahangdale R, Kendall MC, McCarthy RJ, Tureanu L, Doty R Jr, Weingart A, et al. The effects of perineural versus intravenous dexamethasone on sciatic nerve blockade outcomes: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Anesth Analg.* 2014;118(5):1113-9.
  16. Hong JM, Kim KH, Lee HJ, Kwon JY, Kim HK, Kim HJ, et al. Epidural Dexamethasone Influences Postoperative Analgesia after Major Abdominal Surgery. *Pain Physician.* 2017;20(4):261-269.
  17. Lima RM, Navarro LH, Carness JM, Barros GA, Marques ME, Solanki D, et al. Clinical and histological effects of the intrathecal administration of methylprednisolone in dogs. *Pain Physician.* 2010;13(5):493-501.
  18. Thomas S, Beevi S. Epidural dexamethasone reduces postoperative pain and analgesic requirements. *Can J Anaesth.* 2006;53(9):899-905.
  19. Razavizadeh MR, Fazel MR, Heydarian N, Atoof F. Epidural Dexamethasone for Postoperative Analgesia in Patients Undergoing Unilateral Inguinal Herniorrhaphy: A Comparative Study. *Pain Res Manag.* 2017;2017:7649458.
  20. Naghipour B, Aghamohamadi D, Azarfarin R, Mirinazhad M, Bilehjani E, Abbasali D, et al. Dexamethasone added to bupivacaine prolongs duration of epidural analgesia. *Middle East J Anaesthesiol.* 2013;22(1):53-7.
  21. Kim EM, Lee JR, Koo BN, Im YJ, Oh HJ, Lee JH. Analgesic efficacy of caudal dexamethasone combined with ropivacaine in children undergoing orchiopexy. *Br J Anaesth.* 2014;112(5):885-91.
  22. Righeti CCF. Avaliação do efeito analgésico da dexametasona administrada por via peridural na dor aguda pós-operatória de pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas do joelho. Ribeirão Preto, 2014. 52p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
  23. Rijdsdijk M, van Wijck AJ, Kalkman CJ, Meulenhoff PC, Grafe MR, Steinauer J, et al. Safety assessment and pharmacokinetics of intrathecal methylprednisolone acetate in dogs. *Anesthesiology.* 2012;116(1):170-81.
  24. Wahdan AS, El-Sakka AI, Gaafar HMI. The effect of addition of dexamethasone to levobupivacaine in parturients receiving combined spinal-epidural for analgesia for vaginal delivery. *Indian J Anaesth.* 2017;61(7):556-561.
  25. Bani-Hashem N, Hassan-Nasab B, Pour EA, Maleh PA, Nabavi A, Jabbari A. Addition of intrathecal Dexamethasone to Bupivacaine for spinal anesthesia in orthopedic surgery. *Saudi J Anaesth.* 2011;5(4):382-6.

26. Kroin JS, Schaefer RB, Penn RD. Chronic intrathecal administration of dexamethasone sodium phosphate: pharmacokinetics and neurotoxicity in an animal model. *Neurosurgery*. 2000;46(1):178-82.
27. Racoosin JA, Seymour SM, Cascio L, Gill R. Serious Neurologic Events after Epidural Glucocorticoid Injection--The FDA's Risk Assessment. *N Engl J Med*. 2015;373(24):2299-301.
28. Barros GA, Marques ME, Ganem EM. The effects of intrathecal administration of betamethasone over the dogs' spinal cord and meninges. *Acta Cir Bras*. 2007;22(5):361-5.
29. Brown FW. Management of diskogenic pain using epidural and intrathecal steroids. *Clin Orthop Relat Res*. 1977;(129):72-8.
30. Sehgal AD, Tweed DC, Gardner WJ, Foote MK. Laboratory studies after intrathecal corticosteroids: determination of corticosteroids in plasma and cerebrospinal fluid. *Arch Neurol*. 1963;9:64-8.
31. Rice I, Wee MY, Thomson K. Obstetric epidurals and chronic adhesive arachnoiditis. *Br J Anaesth*. 2004;92(1):109-20.
32. Ganem EM, Lima RM. Eventos adversos relacionados aos bloqueios regionais. In: Cangiani LM, Carmona MJC, Torres MLA, Bastos CO, Ferez D, Silva ED, et al. *Tratado de Anestesiologia*. 8 ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2017. p. 1923-45.
33. Cicala RS, Turner R, Moran E, Henley R, Wong R, Evans J. Methylprednisolone acetate does not cause inflammatory changes in the epidural space. *Anesthesiology*. 1990;72(3):556-8.
34. Abram SE, Marsala M, Yaksh TL. Analgesic and neurotoxic effects of intrathecal corticosteroids in rats. *Anesthesiology*. 1994;81(5):1198-205.
35. Williams BA, Hough KA, Tsui BY, Ibinson JW, Gold MS, Gebhart GF. Neurotoxicity of adjuvants used in perineural anesthesia and analgesia in comparison with ropivacaine. *Reg Anesth Pain Med*. 2011;36(3):225-30.
36. Adams KL, Gallo V. The diversity and disparity of the glial scar. *Nat Neurosci*. 2018;21(1):9-15.
37. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35.
38. Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurologic outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology*. 1989;70(1):64-70.
39. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001;23(4):291-9.

40. Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image Processing with Image J. *Biophotonics Int.* 2004;11(7):36-42.
41. Colour Deconvolution. Landini G, 2010. (Accessed 09/14, 2014, at <http://www.mecourse.com/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>)
42. Hoffman GS. Spinal arachnoiditis. What is the clinical spectrum? *Spine (Phila Pa 1976)*. 1983;8(5):538-40.
43. Hurst EW. Adhesive arachnoiditis and vascular blockage caused by detergents and other chemical irritants: an experimental study. *J Pathol Bacteriol.* 1955;70(1):167-78.
44. Burton CV. Lumbosacral arachnoiditis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1978;3(1):24-30.
45. Ganem EM, Vianna PTG, Marques M, Módolo NSP, Braz JRC. Effects of hyperbaric 0.5% bupivacaine contaminated with antiseptic solutions on spinal cord and meninges. Experimental study in dogs. *Reg Anesth Pain Med.* 1993;18 Suppl 1:42.
46. Reichert MG, Butterworth J. Local anesthetic additives to increase stability and prevent organism growth. *Tech Reg Anesth Pain Manag.* 2004;8(3):106-9.
47. Gurun MS, Leinbach R, Moore L, Lee CS, Owen MD, Eisenach JC. Studies on the safety of glucose and paraben-containing neostigmine for intrathecal administration. *Anesth Analg.* 1997;85(2):317-23.
48. Mizuno K, Ogawa S, Itoh S. Suppressive effect of methylparaben on the evoked compound action potentials in excised rabbit cervical vagus nerve. *Masui.* 1994;43(7):1008-14
49. McLain RF. Point of view: the pathologic effects of intrathecal betamethasone. *Spine.* 1997;22(14):1562.
50. Derby R, Lee SH, Date ES, Lee JH, Lee CH. Size and aggregation of corticosteroids used for epidural injections. *Pain Med.* 2008;9(2):227-34.
51. Okubadejo GO, Talcott MR, Schmidt RE, Sharma A, Patel AA, Mackey RB, et al. Perils of intravascular methylprednisolone injection into the vertebral artery. An animal study. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90(9):1932-8.
52. Dawley JD, Moeller-Bertram T, Wallace MS, Patel PM. Intra-arterial injection in the rat brain: evaluation of steroids used for transforaminal epidurals. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(16):1638-43.
53. Gharibo CG, Fakhry M, Diwan S, Kaye AD. Conus Medullaris Infarction After a Right L4 Transforaminal Epidural Steroid Injection Using Dexamethasone. *Pain Physician.* 2016;19(8):E1211-E1214.

54. Watkins TW, Dupre S, Coucher JR. Ropivacaine and dexamethasone: a potentially dangerous combination for therapeutic pain injections. *J Med Imaging Radiat Oncol.* 2015;59(5):571-7.
55. 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(9):802-8.
56. 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(2):127-36.
57. 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(5):433-8.
58. Santos ALQ, Lima AR, Santana MIS. Length of spinal cord topography of medular cone in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Bioscience J (UFU).* 1999;15:45-62.
59. O'Callaghan JP, Brinton RE, McEwen BS. Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. *J Neurochem.* 1991;57(3):860-9.



