

Fernanda Bono Fukushima

Efeitos determinados pela amitriptilina, administrada pela via subaracnóidea, sobre a medula e as meninges. Estudo experimental em cães

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia da Faculdade de Medicina da UNESP, campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Adjunta Eliana Marisa Ganem

Botucatu – SP

2008

Dedicatória

À minha família, com quem primeiro aprendi.
Ao Edison, amado, companheiro e eterno namorado, com quem quero escrever o
resto da minha história.

À minha mestra e orientadora, Prof^a Adjunta ELIANA MARISA GANEM, não existem palavras que expressem meu agradecimento à sua dedicação, entusiasmo e disponibilidade para que esta pesquisa fosse realizada.
Meu eterno reconhecimento e gratidão.

“Há escolas que são gaiolas. Há escolas que são asas”.

“Escolas que são gaiolas existem para que os pássaros desaprendam a arte do vôo. Pássaros engaiolados são pássaros sob controle.

Engaiolados, o seu dono pode levá-las para onde quiser. Pássaros engaiolados sempre têm um dono. Deixaram de ser pássaros.

Porque a essência dos pássaros é o vôo.

Escolas que são asas não amam pássaros engaiolados. O que eles amam são pássaros em vôo. Existem para dar aos pássaros coragem para voar. Ensinar o vôo, isso elas não podem fazer, porque o vôo já nasce dentro dos pássaros. O vôo não pode ser ensinado. Só pode ser encorajado”

Agradecimentos Especiais

A todos os docentes do Departamento de Anestesiologia
da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial

Prof^a Adjunta Eliana Marisa Ganem,
Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros,
Prof. Adjunto Lino Lemonica,
Prof. Titular Pedro Thadeu Galvão Vianna,
Prof. Titular José Reinaldo Cerqueira Braz,
Prof^a Titular Yara Marcondes Machado Castilha e
Prof^a Adjunta Norma Sueli Pinheiro Módolo

por sempre me apoiarem nesse aprendizado.

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas e de maneira particular:

a todos os colegas do Departamento de Anestesiologia;

à Prof^a Adjunta Mariângela Esther Alencar Marques, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela orientação e auxílio no diagnóstico histológico e pelas sugestões relativas à sua especialidade;

aos funcionários do Laboratório Experimental de Anestesiologia, Cristiano Correa de Oliveira e Jurandir Antônio, pela colaboração imprescindível na execução do trabalho prático;

ao funcionário Mauri Raul, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, UNESP, pela colaboração quanto ao sacrifício dos animais e à retirada das peças anatômicas;

aos funcionários Celene Maria Gandin, Luiz Fernando Franchi e Marcos Roberto Franchi, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela elaboração das lâminas histológicas;

à funcionária Cristina Aparecida Dorico, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pelo auxílio na digitalização das lâminas histológicas;

aos funcionários da Secretaria do Departamento de Anestesiologia e do Serviço de Terapia Antálgica e Cuidados Paliativos da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

*"Creio que dizer uma coisa é conservar-lhe a
virtude e tirar-lhe o terror."*

Bernardo Soares - Fernando Pessoa

Sumário

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO	14
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. ANIMAIS UTILIZADOS	25
2.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	25
2.3. SEQÜÊNCIA EXPERIMENTAL	26
2.4. TÉCNICAS UTILIZADAS	27
2.5. SACRIFÍCIO	30
2.6. EXAME HISTOLÓGICO	30
2.7. COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO EM ANIMAL	31
2.8. MODELO DE ESTUDO	31
2.9. MÉTODO ESTATÍSTICO	31
3. RESULTADOS	32
4. DISCUSSÃO	37
4.1. DISCUSSÃO DA METODOLOGIA	37
4.2. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	47
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE	66

Lista de Quadros

Quadro 1	Algumas das condições clínicas mais comuns que podem desencadear dor neuropática.....	16
Quadro 2	Anormalidades sensitivas comuns na dor neuropática de acordo com diferentes parâmetros.....	17
Quadro 3	Locais de ação dos antidepressivos tricíclicos.....	20
Quadro 4	Antidepressivos da classe dos tricíclicos.....	21
Quadro 5	Ação antiinflamatória da amitriptilina.....	42

Lista de Tabelas

Tabela 1	Resultados referentes ao peso (kg) e ao comprimento de coluna vertebral (cm) dos animais pertencentes aos três grupos experimentais, expressos em média e desvio-padrão.	32
Tabela 2	Resultados referentes ao relaxamento do esfíncter anal, ao bloqueio motor, à analgesia dolorosa térmica e dolorosa pressórica avaliada uma hora após a administração das soluções nos grupos estudados.....	33
Tabela 3	Resultados referentes às observações histológicas dos grupos estudados.....	34

Lista de Figuras

Figura 1	Tecido nervoso, vasos sangüíneos e meninges normais. H E 100x.....	35
Figura 2	Tecido nervoso e meninges normais, com destaque para a aracnóide (seta). H E 400x.....	35
Figura 3	Tecido nervoso normal, vasos sanguíneos espessados (seta) e espessamento fibroso e aderência das meninges. H E 400x.....	36
Figura 4	Tecido nervoso normal, vasos sangüíneos espessados (seta) e espessamento fibroso e aderência das meninges. Tricrômico de Masson 400x.....	36
Figura 5	Mecanismo de ação clássico dos antidepressivos tricíclicos.....	40
Figura 6	Semelhanças estruturais entre anestésicos locais e antidepressivos.....	41
Figura 7	Fórmula Molecular da Amitriptilina.....	41
Figura 8	Ângulo de inserção de agulha para realização de punção subaracnóidea em modelo de coluna vertebral de cães...	66
Figura 9	Ângulo de inserção de agulha para realização de punção subaracnóidea em modelo de coluna vertebral de cães...	66
Figura 10	Região terminal da medula espinhal do cão (Fletcher, 1979).....	67
Figura 11	Dermátomos lombares, sacrais e coccígeos do cão (Fletcher, 1979).....	68

Fukushima, FB. *Efeitos determinados pela amitriptilina, administrada pela via subaracnóidea, sobre a medula e as meninges. Estudo experimental em cães*. Botucatu, 2008. 68p. Tese (Doutorado em Anestesiologia) – Faculdade de Medicina, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

Resumo

Introdução e Objetivo: A amitriptilina é o protótipo dos antidepressivos tricíclicos, classe de fármaco muito utilizada no tratamento da dor neuropática. Tem por propriedade principal a inibição da recaptção de serotonina e noradrenalina, além de interagir com diversos outros receptores. Estudos recentes demonstraram que os antidepressivos tricíclicos são potentes bloqueadores dos canais de sódio, potássio e cálcio, apresentando propriedades semelhantes aos anestésicos locais. Assim existe potencial para que esta classe farmacológica possa ser utilizada no neuroeixo como adjuvante anestésico local ou no tratamento de síndromes dolorosas neuropáticas refratárias. Entretanto, até o presente momento, não há consenso quanto a neurotoxicidade desta classe farmacológica sobre a medula e as meninges. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a toxicidade da amitriptilina sobre a medula e as meninges quando administrada pela via subaracnóidea em cães.

Método: Vinte e um animais foram randomizados em três grupos que receberam pela via subaracnóidea: Grupo 1 - Solução fisiológica 0,9%; Grupo 2 - solução de amitriptilina 5 mmol.ml⁻¹; Grupo 3- solução de amitriptilina 10 mmol.ml⁻¹. A punção subaracnóidea foi realizada no espaço intervertebral L6-L7. O volume da solução injetada foi de 1 ml. Os animais foram avaliados após uma hora da administração do fármaco e durante os 21 dias que permaneceram em cativeiro quanto ao tônus do esfíncter anal, bloqueio motor e sensibilidade dolorosa. Os animais foram sacrificados por eletrocussão sob anestesia. A medula e as meninges fixadas com solução de formalina 10%, coradas pelos métodos hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson, para posterior análise histológica. O estudo foi duplamente encoberto. Para avaliação estatística foi utilizada a análise de variância.

Resultados: Durante o período de observação de 21 dias os animais mantiveram-se sadios. Todos os animais recobriram a função motora e o tônus esfíncteriano. Com a exceção de 1 animal pertencente ao grupo 2, todos os animais dos grupos 2 e 3 apresentaram quadro de aracnoidite adesiva. Não houve lesão de tecido nervoso em nenhum animal estudado.

Conclusão: A administração subaracnóidea de amitriptilina não determinou alteração sobre o tecido nervoso, porém esteve associada a alterações histológicas às meninges de cães.

Palavras-Chave: cães, amitriptilina, neurotoxicidade, antidepressivo tricíclico, toxicidade sobre as meninges, aracnoidite, espaço subaracnóideo.

Fukushima, FB. *Effects of intraspinal amitriptyline on spinal cord and meninges. Experimental study in dogs*. Botucatu, 2008 68p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology) – Botucatu Medical School, UNESP - São Paulo State University.

Abstract

Introduction: Amitriptyline is the prototype drug of the tricyclic antidepressants, which are commonly used as adjuvant medications in the treatment of neuropathic pain syndromes. It is an inhibitor of the reuptake of serotonin and norepinephrine, as well as a blocking agent for great number of receptors. Recent reports have demonstrated tricyclic antidepressants as potent blocking agents for voltage-dependent ionic Na⁺, K⁺ and Ca⁺⁺ channels. Presenting a local anesthetic property. Hence there is a potential role for the intra-spinal use of amitriptyline as an adjuvant in neuroaxial anesthesia and in the treatment of refractory neuropathic pain. Nevertheless, to our knowledge there is no known information regarding the possible neural and meningeal effects of neuraxial amitriptyline administration. Therefore, we conducted a study to evaluate the neural and meningeal toxicities profiles of the intraspinal administration of amitriptyline to dogs.

Methods: 21 Dogs were randomly selected for one of three groups: Group 1- 0,9% saline; Group 2- amitriptyline 5 mmol.ml⁻¹ solution; Group 3- amitriptyline 10 mmol.ml⁻¹ solution. In each of the groups one milliliter of the randomized solution was intraspinally administered by an investigator blinded for the intervention group. The dogs were evaluated one hour after awaking from the anesthesia and the following 21 days in the three following domains: anal sphincter tone, motor blockage and pain. The dogs were sacrificed by electrocution under anesthesia, the spinal cords were removed, fixed in 10% Formalin solution, stained by hematoxylin and eosin and Masson's trichrome technique for posterior histological analysis. We used analysis of variance to assess for differences among the treatment groups.

Results: During the 21 days of observation after the procedure, all dogs recovered motor function and anal sphincter tone. With the exception of one dog in group 2 all the other dogs in group 3 and in group 2 displayed marked adhesive arachnoiditis, which was absent in all the controls in group 1. In none of the groups were direct neural lesions observed.

Conclusion: The intraspinal administration of amitriptyline in dogs was not related with direct histological neural lesions but was significantly associated with the development of meningeal adhesive arachnoiditis.

Key-Words: dogs, amitriptyline, neurotoxicity, tricyclic antidepressants, meningeal toxicity, arachnoiditis, subarachnoid space

1 Introdução e Objetivo

A sensação dolorosa é uma experiência física e emocional e está presente em diferentes momentos da vida do ser humano desde o seu nascimento até o momento da sua morte. É uma experiência muitas vezes intensa que pode controlar e mudar drasticamente os pensamentos e o comportamento do ser humano.

Estudos europeus mostram que aproximadamente 50% da população adulta padece de um ou mais tipos de dor durante o transcorrer de suas vidas (European Federation of IASP Chapters, 2001). Esta porcentagem aumenta drasticamente com o avançar da idade sendo considerada hoje um grande problema de saúde pública mundial. Em estudo realizado nos Estados Unidos da América (EUA) estima-se que de 45 a 80% dos idosos institucionalizados e de 25 a 50% da população idosa residente na comunidade apresentem algum tipo de dor, interferindo na qualidade de vida (Ahmad & Goucke, 2002).

A dor exerce também impacto negativo sobre a economia do país e sobre a qualidade de vida de pacientes portadores de doenças debilitantes. Este impacto torna-se ainda mais preocupante quando a dor aguda progride para dor crônica. A dor crônica é aquela que persiste além do período de reparação tecidual (Merskey & Bogduk, 1994). Em termos práticos esse período de tempo é variável, podendo ser inferior a um mês ou, mais freqüentemente, superior a seis meses.

Qualquer dor crônica exerce influência na qualidade de vida do indivíduo afetado, comprometendo o humor, a mobilidade, o sono e a realização das atividades da vida diária. Dentre as dores crônicas merecem destaque as de origem neuropática. Dores neuropáticas são aquelas iniciadas ou causadas por lesão, disfunção ou alteração transitória do sistema nervoso central ou periférico (Merskey & Bogduk, 1994).

Ao contrário daquelas de origem inflamatória ou predominantemente nociceptivas as síndromes de dor neuropática são de difícil diagnóstico, freqüentemente mal interpretadas, os pacientes são estigmatizados e a condição tratada inadequadamente. Este cenário torna-se ainda mais problemático pela dificuldade em se obter medicação para o seu tratamento, seja pelo alto custo, pelas barreiras sociais e governamentais e também pela dificuldade na eficácia dos fármacos existentes.

Apesar da escassez e da falta de uniformidade dos dados epidemiológicos na literatura, estima-se que mais de quatro milhões de pessoas nos EUA padeçam de dor neuropática, sendo que mais de três milhões apresentam neuropatia diabética (Schmader, 2002) e mais de um milhão possuem neuralgia pós-herpética (Bowsher, 1999). Dentro da casuística da disciplina de dor da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP entre 1984 e 1986, as dores neuropáticas corresponderam a 22,7% das dores de origem não oncológica (Pavani et al., 1988). Com o envelhecimento progressivo da população mundial e do aumento das doenças crônico-degenerativas, esta entidade clínica adquire maior importância.

A dor neuropática pode originar-se de diferentes níveis na via somato-sensorial, desde o nociceptor periférico até o córtex. As suas causas são classificadas clinicamente de acordo com o padrão sintomatológico, a localização neuro-anatômica e a etiologia (Hansson, 2005). No quadro que segue encontram-se as entidades clínicas que mais comumente a desencadeiam (Quadro 1).

Quadro 1 – Condições clínicas comuns que podem desencadear dor neuropática

<p>Periférica</p> <ul style="list-style-type: none">• lesão de nervo periférico traumática ou iatrogênica• neuropatia isquêmica• compressão de nervo periférico• polineuropatia (hereditária, paraneoplásica, nutricional, por amiloidose, por vasculite)• lesão de plexo• compressão radicular• amputação/ membro fantasma• neuralgia do trigêmio / glossofaríngeo• neuropatia relacionada ao câncer (invasão tumoral, lesão cirúrgica, induzida por radio ou quimioterapia) <p>Central</p> <ul style="list-style-type: none">• acidente isquêmico/hemorrágico cerebral• esclerose múltipla• trauma raqui-medular• siringomielia / siringobulbia
--

Adaptado de Hansson PT, 2005.

Deve-se ressaltar que ainda não se conhecem os fatores que predizem se determinada lesão neural seja dolorosa ou não. Também não existem estudos em pacientes com dor neuropática correlacionando a intensidade, a natureza e a gravidade da lesão neural (Basbaum et al., 2005). Uma das dificuldades inerentes às pesquisas nesta área relaciona-se à própria definição de dor como experiência multifatorial.

O diagnóstico de dor neuropática é essencialmente clínico. Não há teste diagnóstico específico ou sinal e sintoma patognomônico. Pode apresentar-se clinicamente com diferentes sintomas sendo mais freqüentemente como dor crônica associada a alterações da sensibilidade. Na região acometida podem coexistir diferentes sintomas e sinais clínicos, tanto de diminuição como de aumento da sensibilidade (Quadro 2). Nos casos de aumento da sensibilidade, este pode manifestar-se como disestesia (sensibilidade alterada e incômoda ao paciente, desencadeada por estímulo ou espontaneamente), hiperalgesia (resposta exagerada à dor), alodínea (dor provocada por estímulo não doloroso) e hiperpatia (resposta exagerada ao estímulo, especialmente repetitivo, bem como diminuição do limiar doloroso) (Merskey & Bogduk, 1994). A intensidade destes sintomas pode comprometer significativamente a execução de atividades simples da vida diária como o simples vestir-se com uma camisa (Meyer-Rosberg et al., 2001). Tudo isso transforma o tratamento das síndromes dolorosas neuropáticas em um dos grandes desafios na prática diária de especialistas no tratamento da dor crônica.

Quadro 2 – Anormalidades sensitivas comuns na dor neuropática de acordo com diferentes parâmetros

Quantitativo	Qualitativo	Espacial	Temporal
hipoestesia	alodínea	não localização	após estímulo
hiperestesia	disestesia	irradiação	latência alterada
hipoalgesia	parestesia	dor referida	
hiperalgesia			

Adaptado de Hansson PT, 2005.

Na última década o conhecimento fisiopatológico da dor neuropática ampliou-se consideravelmente. Sabe-se que o fenômeno doloroso é produto da combinação de fenômenos centrais e periféricos.

Periféricamente observa-se a sensibilização das fibras A δ e C, ativação de nociceptores silentes e transmissão efática entre a fibra nociceptora e a mecanoceptora. Já centralmente nota-se a perda da inibição mediada pelas fibras A β no corno dorsal da medula, a sensibilização central, o crescimento da área mecanoceptora na medula e a ativação do sistema facilitador descendente (Loeser et al., 2000, Ballantyne et al., 2002).

A sensibilização central é considerada o mecanismo principal da perpetuação da dor neuropática e acredita-se que está envolvida no desenvolvimento da alodínea, da hiperalgesia e da hiperpatia. Nesse processo estão envolvidos receptores como o N-metil-D-aspartato (NMDA), o ácido α -amino-3hidroxi-5metil-4-isoxazolepropriônico (AMPA) e o M-glutamato (M-glu). Os aminoácidos glutamato e aspartato são liberados em resposta ao estímulo nocivo e ligam-se a receptores do tipo NMDA no corno dorsal da medula, desencadeando o fenômeno de sensibilização central (Loeser, et al., 2000).

A hiperalgesia também pode iniciar-se pela sensibilização dos nociceptores periféricos a lesão tecidual ou a inflamação e conseqüente liberação de mediadores inflamatórios (Treede et al., 1992). Dentre os mediadores envolvidos estão a interleucina 6 (IL-6), a ciclooxigenase 2 (COX-2) e os receptores para prostaglandina E2 (PGE2), EP1 e EP2 que sofrem regulação positiva pelos macrófagos e parecem contribuir para o desenvolvimento da dor neuropática (Ma & Quirion, 2005). Outros fatores

incluem a sensibilização de neurônios sensitivos aferentes ao sódio e o recrutamento de neurônios silentes (Lisney & Devor, 1987, Kajander et al., 1992, Michaelis et al., 1996).

Além disso, na dor neuropática crônica há aumento na densidade de canais de sódio tanto no local da lesão como na área correspondente do corno dorsal da medula (Devor, 2006, Lampert et al., 2006) o que explica a redução da dor espontânea em resposta à infusão venosa de lidocaína (Attal et al., 2000, Dirks et al., 2000, Tremont-Lukats et al., 2005, Tremont-Lukats et al., 2006). A despolarização espontânea dos neurônios de alta frequência, outro provável mecanismo, também pode ser bloqueada pelos anestésicos locais (Tremont-Lukats, et al., 2005), ampliando o papel destes fármacos no tratamento desta síndrome dolorosa.

Até o presente momento nenhuma classe farmacológica mostrou-se eficaz em tratar todos os pacientes com dor neuropática de mesma etiologia. A dificuldade no tratamento adequado deve-se ao fato de que um mesmo sintoma pode ser desencadeado por diferentes mecanismos fisiopatológicos (Woolf & Decosterd, 1999, Woolf & Max, 2001).

Os antidepressivos tricíclicos são, após os analgésicos simples e antiinflamatórios não esteroidais, os fármacos mais utilizados no tratamento da dor (Ferrell, 2000). Têm sido usados por mais de 40 anos no tratamento da dor neuropática. O tratamento, com amitriptilina, da polineuropatia diabética, uma causa comum de neuropatia periférica, apresenta NNT (*number need to treat*) - número de pacientes tratados para que um paciente se beneficie do tratamento - de três (IC 95% 2,4-4) (McQuay et al., 1996). Comparada a tratamentos bem

estabelecidos para doenças prevalentes na população mundial esse valor é bastante baixo. Por exemplo, o uso de aspirina em pacientes com angina instável para prevenção de morte ou infarto agudo do miocárdio em um ano apresenta NNT de 25 e o NNT da endarterectomia para prevenção de acidente vascular cerebral ou morte em dois anos é de nove (Farkouh et al., 1994).

Diversos níveis de evidência comprovam que os antidepressivos tricíclicos apresentam mecanismos de ação distintos para a sua ação na depressão e na dor. A ação analgésica freqüentemente inicia-se antes da ação antidepressiva e ocorre até mesmo em pacientes sem sintomas depressivos (Scadding, 2004).

Os antidepressivos tricíclicos têm por mecanismo de ação clássica, a inibição da recaptação de norepinefrina e serotonina na fenda pré-sináptica, contudo é de conhecimento que estas são apenas parte dos seus inúmeros sítios de ação. O quadro que se segue lista os locais de ação dos antidepressivos tricíclicos (Quadro 3)

Quadro 3 – Locais de ação dos antidepressivos tricíclicos**Antagonista de receptores**

- adrenérgicos alfa 2 a (Gray et al., 1999, Ghelardini et al., 2000)
- nicotínicos (Bryson & Wilde, 1996)
- muscarínicos (Bryson & Wilde, 1996)
- NMDA (Cai & McCaslin, 1992, McCaslin et al., 1992, Eisenach & Gebhart, 1995a)
- GABA_B (Zarrindast et al., 2000)
- histaminérgicos (Kanof & Greengard, 1978)

Agonista de receptores

- opióides (Biegon & Samuel, 1980, Isenberg & Cicero, 1984, Gray et al., 1998)
- adenosina A1 (Phillis & Wu, 1982, Sawynok & Reid, 1992, Sawynok et al., 1999)

O efeito antagonista nos receptores colinérgicos e histaminérgicos confere a estes fármacos alta incidência de efeitos adversos, principalmente na população idosa. Nesta população sintomas anticolinérgicos como o bloqueio cardíaco, a hipotensão ortostática, a retenção urinária e a constipação intestinal podem ser intoleráveis.

Os antidepressivos tricíclicos são metabolizados pelo citocromo P450 enzima (CYP) 2D6 e uma pequena parcela da população (7%) é incapaz de realizar a demetilação de fármacos como a amitriptilina, apresentando, portanto, maior sensibilidade e toxicidade quando exposta ao fármaco. Por todos estes motivos são contra-indicados no paciente com bloqueio cardíaco, com glaucoma de ângulo fechado e com prostatismo (Ahmad & Goucke, 2002).

Os antidepressivos da classe dos tricíclicos estão citados no Quadro 4. Dentre estes se destaca a amitriptilina (Figura 7) por ser a mais estudada e a que representa os outros antidepressivos da classe.

Quadro 4 – Antidepressivos da classe dos tricíclicos

- amitriptilina
- amoxapina
- clomipramina
- desipramina
- doxepina
- imipramina
- lofepramina
- nortriptilina
- opipramiol
- protriptilina
- trimipramina

A amitriptilina demonstrou ser capaz de bloquear diversos tipos de canais iônicos voltagem-dependentes como Na^+ , K^+ e Ca^{++} , envolvidos na ativação do potencial de ação. Deve-se destacar sua ação bloqueadora dos canais de sódio, que a aproxima dos anestésicos locais (Pancrazio et al., 1998).

Estudos experimentais em ratos evidenciaram que a amitriptilina apresenta também ação bloqueadora NMDA semelhante à cetamina (Reynolds & Miller, 1988). Quando administrada pela via subaracnóidea, em ratos, apresentou ação anti-hiperalgésica, por provável diminuição da sensibilização central (Eisenach & Gebhart, 1995a).

Pela sua afinidade a múltiplos receptores, pela ação semelhante à dos anestésicos locais, pela ação antagonista NMDA, pela possibilidade de utilização na hiperalgisia induzida por opióides e pelo emprego já consagrado pela via oral para tratamento de síndromes dolorosas crônicas, especialmente na dor neuropática, a amitriptilina apresenta grande potencial para ser administrada pelas vias peridural ou subaracnóidea, o que possibilitaria redução na dose e, conseqüentemente, nos efeitos sistêmicos, além de potencializar os efeitos centrais.

Entretanto os anestésicos locais, em algumas situações, podem ser tóxicos ao tecido nervoso. A neurotoxicidade dos anestésicos locais pode-se manifestar por síndrome da cauda eqüina (Jaradeh, 1993). É descrito que a neurotoxicidade da lidocaína é maior que a de outros anestésicos locais (Yamashita et al., 2003) e que as alterações histológicas e neurofuncionais

tornam-se mais graves e extensas com o aumento da concentração (Ganem et al., 1996, Takenami et al., 2004, Pires et al., 2006).

A síndrome da cauda eqüina caracteriza-se por disfunção vesical e intestinal, perda de sensibilidade em área de períneo e graus variáveis de fraqueza muscular nos membros inferiores.

Já a aracnoidite adesiva, outra complicação dos bloqueios do neuroeixo, apresenta quadro clínico semelhante ao da síndrome da cauda eqüina, com sintomas que se iniciam em períodos que variam de semanas a meses após a realização do bloqueio, podendo ser permanentes ou apresentar regressão lenta e gradual (Kane, 1981, Horlocker & Wedel, 1993).

A aracnoidite adesiva distingue-se da síndrome da cauda eqüina por que o seu início é lento, aparecendo alguns dias ou semanas após a realização do bloqueio, podendo levar à paraplegia e à morte (Kane, 1981).

Existe reação proliferativa das leptomeninges, tornando-se fibróticas, aderidas umas às outras, à medula e à dura mater (Greene, 1961, Kane, 1981). Ocorre obliteração dos espaços subdural e subaracnóideo em decorrência da formação de trabéculas, com deformidade das raízes e constrição do tecido medular (Kane, 1981, Jaradeh, 1993). Há formação de bolsões semelhantes à cistos, que contém fluido xantocrômico e diminuição do aporte sangüíneo medular (Woods & Franklin, 1951, Kane, 1981).

À microscopia, observa-se, inicialmente, congestão da aracnóide, seguida por espessamento e finalmente adesão desta à pia-máter (Courville, 1955). Este processo pode estender-se à dura-máter, obliterando o espaço subaracnóideo (Courville, 1955).

Sabe-se que, quando a via peridural é selecionada para a administração de fármacos, existe a possibilidade de injeção subaracnóidea inadvertida (Vanni, 2004), o que ocorre com a frequência aproximada de 5% (Bogduk, 1994).

Todas as vezes que um novo agente é utilizado na prática clínica, mesmo que seja considerado seguro quando administrado pela via intravenosa ou peridural, ele não o é, obrigatoriamente, quando administrado no espaço subaracnóideo (Yaksh & Collins, 1989). Para se assegurar a ausência de toxicidade, este agente deve ser testado em grande número de animais, de diferentes espécies, antes que seja administrado no homem.

Pela possível aplicabilidade clínica da amitriptilina como analgésico coadjuvante a ser administrado pelas vias subaracnóidea e peridural, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos que diferentes doses de amitriptilina, administradas pela via subaracnóidea, determinariam sobre a medula espinhal e meninges de cães.

2 Materiais e Métodos

2.1 Animais utilizados

Foram utilizados 21 cães adultos, de ambos os sexos, sem raça definida, com pesos que variaram de 7 a 16 quilogramas e comprimento de coluna vertebral de 53 a 70 centímetros, fornecidos pelo Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Na seleção dos animais foram excluídos do experimento os que não apresentavam aspecto sadio e que tivessem necessidade de mais de uma punção subaracnóidea, bem como aqueles em que se obtivesse líquido hemorrágico, o que caracterizava acidente de punção.

Os animais foram randomizados em três grupos experimentais.

2.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais, com sete animais em cada grupo, submetidos, inicialmente, à anestesia venosa com etomidato e fentanil e, em seguida, à punção subaracnóidea. Os grupos diferenciaram-se pela solução e pela dose de amitriptilina administrada por via subaracnóidea, sendo o volume de um mililitro mantido constante, ou seja:

Grupo 1 (G1) – Controle - Solução salina a 0,9%

Grupo 2 (G2) – Solução de 5 mmol de amitriptilina

Grupo 3 (G3) – Solução de 10 mmol de amitriptilina

2.3 Seqüência experimental

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

- 2.3.1 Jejum alimentar de 12 horas com livre acesso à água.
- 2.3.2 Pesagem.
- 2.3.3 Anestesia com etomidato e fentanil.
- 2.3.4 Posicionamento do animal em decúbito ventral em goteira.
- 2.3.5 Medida do comprimento da coluna vertebral.
- 2.3.6 Limpeza local com água e sabão.
- 2.3.7 Tricotomia.
- 2.3.8 Limpeza do local com solução salina fisiológica estéril.
- 2.3.9 Anti-sepsia com gluconato de clorexidina a 2%.
- 2.3.10 Colocação de campo estéril.
- 2.3.11 Palpação e identificação dos espaços intervertebrais.
- 2.3.12 Punção subaracnóidea com obtenção de líquido.
- 2.3.13 Injeção da solução sorteada.
- 2.3.14 Retirada do animal da goteira.
- 2.3.15 Observação clínica até recuperação da anestesia.
- 2.3.16 Manutenção em catifeiro durante 21 dias.
- 2.3.17 Sacrifício do animal.
- 2.3.18 Remoção da medula espinhal em sua porção lombar e sacral.
- 2.3.19 Fixação da peça anatômica.
- 2.3.20 Realização da microscopia óptica.

2.4 Técnicas utilizadas

2.4.1 Preparo do animal

2.4.1.1 Após período de jejum de 12 horas com livre acesso à água, os animais foram pesados e anestesiados com injeção venosa de etomidato, na dose de 2 mg.kg^{-1} de peso corporal, e fentanil, na dose de $0,005 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corporal.

2.4.1.2 Após a anestesia venosa, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre a goteira de Claude Bernard e para obtenção do comprimento da coluna vertebral mediu-se a distância entre a protuberância occipital e o início da cauda.

2.4.1.3 Foi realizada a limpeza da pele e pêlos da região da coluna vertebral com água e sabão seguida de tricotomia em área de 10 cm ao redor do local onde foi realizada a punção, correspondente ao espaço intervertebral L6 – L7. Esta região foi lavada com solução fisiológica a 0,9% e, após a anti-sepsia com solução tópica de gluconato de clorexidina a 2% , foram colocados os campos estéreis.

2.4.2 Anestesia subaracnóidea

2.4.2.1 Técnica de punção

Para identificação dos espaços intervertebrais e determinação do local da punção subaracnóidea, palpavam-se as duas tuberosidades do osso

ilíaco e o processo espinhoso da última vértebra lombar. Imediatamente abaixo, localizava-se o espaço lombo-sacral e, deslizando-se o indicador em direção cefálica, o próximo espaço intervertebral encontrado era L6-L7.

A punção subaracnóidea, realizada com agulha de Quincke de calibre 22 G, foi feita por acesso mediano com ângulo de inclinação de aproximadamente 45°. Ao se aprofundar a agulha observava-se aumento na resistência à introdução da mesma, correspondente ao ligamento amarelo, e nova pequena resistência era encontrada, quando se ultrapassava a dura-máter e aracnóide. Retirava-se o mandril da agulha e obtinha-se o escoamento do líquido cefalorraquidiano.

Após a obtenção do líquido, a agulha de punção foi posicionada com o orifício de escoamento do anestésico local em posição caudal, para injeção da solução salina a 0.9% no grupo G1 e da amitriptilina nos grupos G2 e G3. Foram registradas as dificuldades na realização da punção e a coloração do líquido cefalorraquidiano que escoou pela agulha.

2.4.2.2 Injeção da solução

A solução previamente sorteada foi injetada durante aproximadamente 10 segundos, em seringa de 1ml, descartável.

2.4.2.3 Fármaco administrado

O fármaco administrado nesta pesquisa foi o hidrocloreto de amitriptilina, sintetizado por farmácia magistral, livre de preservantes químicos, não pirogênico, com pH 5.5. Este foi diluído em solução fisiológica, em frascos

individuais contendo um mililitro de solução de amitriptilina a 5 mmol ou 10 mmol, preservada a aproximadamente 4° C, protegida da luminosidade e administrada aproximadamente 36 horas após envasamento.

2.4.2.4 Observação clínica

Após a injeção da solução sorteada, os animais foram imediatamente retirados da goteira de Claude Bernard e uma hora após, quando recuperados da anestesia venosa, foram avaliados clinicamente quanto ao bloqueio motor, ao grau de relaxamento do esfíncter anal, à sensibilidade dolorosa e à sensibilidade térmica dolorosa. O bloqueio motor e relaxamento esfínteriano foram avaliados pela observação clínica uma hora após a administração da solução escolhida. Na seqüência avaliou-se a sensibilidade dolorosa através de preensão da membrana interdigital das patas traseiras e dianteiras, bem como da pele da região dos dermatomos sacrais, lombares e torácicos, com auxílio de pinça dente de rato. A sensibilidade térmica dolorosa foi avaliada por meio de termoalgômetro registrando 50°C por 10 segundos em membranas interdigitais traseiras e dianteiras.

Os animais permaneceram em cativeiro durante 21 dias, sob observação clínica. Foram verificados os seguintes parâmetros: relaxamento do esfíncter anal, perda da força muscular nas patas posteriores (paralisia), capacidade de movimentar e manter levantada a cauda e alteração na sensibilidade dolorosa. A sensibilidade foi avaliada através da observação dos seguintes sinais indicativos de dor: retração da pata, mudança de postura, face

com expressão de angústia e gemência após a aplicação dos estímulos dolorosos descritos acima.

2.5 Sacrifício

O sacrifício foi realizado por eletrocussão, após anestesia prévia com pentobarbital sódico. As porções lombar e sacral da medula espinhal e as raízes da cauda eqüina foram retiradas em tempo inferior a 3 minutos e fixadas em solução de formalina a 10% para posterior exame histológico.

2.6 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, dez centímetros acima do local onde foi realizada a punção subaracnóidea, estendendo-se até o final da cauda eqüina, em intervalos de meio centímetro. Os cortes do tecido medular foram colocados em blocos de parafina e corados pelo método de hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson.

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 apresentaram alterações, ou lesados, determinando-se os achados observados.

2.7 Comissão de Ética em Experimentação em Animal

A presente pesquisa foi submetida à aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu.

2.8 Modelo de estudo

Este estudo foi controlado, randomizado e encoberto.

2.9 Método estatístico

Tendo como objetivo avaliar a homogeneidade dos grupos com relação ao peso e ao comprimento da coluna vertebral, foi realizada, como método estatístico, a análise de variância (ANOVA), sendo adotado como limite para significância estatística um valor de α de 0,05.

3 Resultados

A análise estatística dos três grupos experimentais constatou que houve homogeneidade entre os grupos com relação ao peso ($F = 1,09$ e $p = 0,35$) e ao comprimento de coluna vertebral ($F = 0,48$ e $p = 0,63$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados referentes ao peso (kg) e ao comprimento de coluna vertebral (cm) dos animais pertencentes aos três grupos experimentais, expressos em média e desvio-padrão

	SF 0,9% (G1)	AMT 5mmol - (G2)	AMT 10mmol - (G3)	p
Peso (kg)	9,7 ± 2,67	11,75 ± 2,91	11,33 ± 3,04	0,36
Comprimento da coluna vertebral (cm)	59,8 ± 4,87	62,75 ± 6,38	61,44 ± 6,27	0,63

SF = Solução salina fisiológica; AMT = amitriptilina.

Nenhum animal de G1, G2 ou G3 apresentou alterações clínicas durante o período de cativeiro. Não foram observadas alterações na sensibilidade térmica, na sensibilidade dolorosa, no bloqueio motor ou alteração do tônus do esfíncter anal nos animais de G1, na avaliação clínica realizada uma hora após a administração da solução fisiológica. Todos os animais pertencentes aos grupos 2 e 3 apresentaram bloqueio motor e relaxamento esfínteriano na avaliação realizada uma hora após a administração da amitriptilina pela via subaracnóidea. Doze animais

apresentaram alteração da sensibilidade dolorosa à pressão, seis pertencentes ao grupo 2 e seis pertencentes ao grupo 3. Seis dos sete animais pertencentes ao grupo 2 e cinco dos sete animais do grupo 3 apresentaram a sensibilidade álgica térmica abolida (Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados referentes ao relaxamento do esfíncter anal, ao bloqueio motor, à analgesia dolorosa térmica e dolorosa pressórica avaliada uma hora após a administração das soluções nos grupos estudados

	Relaxamento do esfíncter anal	Bloqueio Motor	Analgesia dolorosa térmica	Analgesia dolorosa pressórica
Grupo 1	0	0	0	0
Grupo 2	7	7	6	6
Grupo 3	7	7	5	6

Nenhum cão do G1 apresentou alterações histológicas na medula espinhal, nas raízes nervosas e nas meninges (Figura 1).

Em seis animais de G2 e em sete animais de G3 foram observados espessamento fibroso da aracnóide com infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, linfócitos e plasmócitos entre a aracnóide, a pia-máter e a dura-máter, formação de trabéculas e espessamento da parede dos vasos (Figura 3, Figura 4). Não foram observadas alterações histológicas na medula espinhal e nas raízes nervosas em nenhum dos animais pertencentes aos três grupos do estudo (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultados referentes às observações histológicas dos grupos estudados

	Vasos		Meninges		Tecido Nervoso	
	Normal	Espessamento da parede vascular	Normal	Espessamento fibroso com infiltrado inflamatório e formação de trabéculas	Normal	Necrose
Grupo 1	7	0	7	0	7	0
Grupo 2	1	6	1	6	7	0
Grupo 3	0	7	0	7	7	0

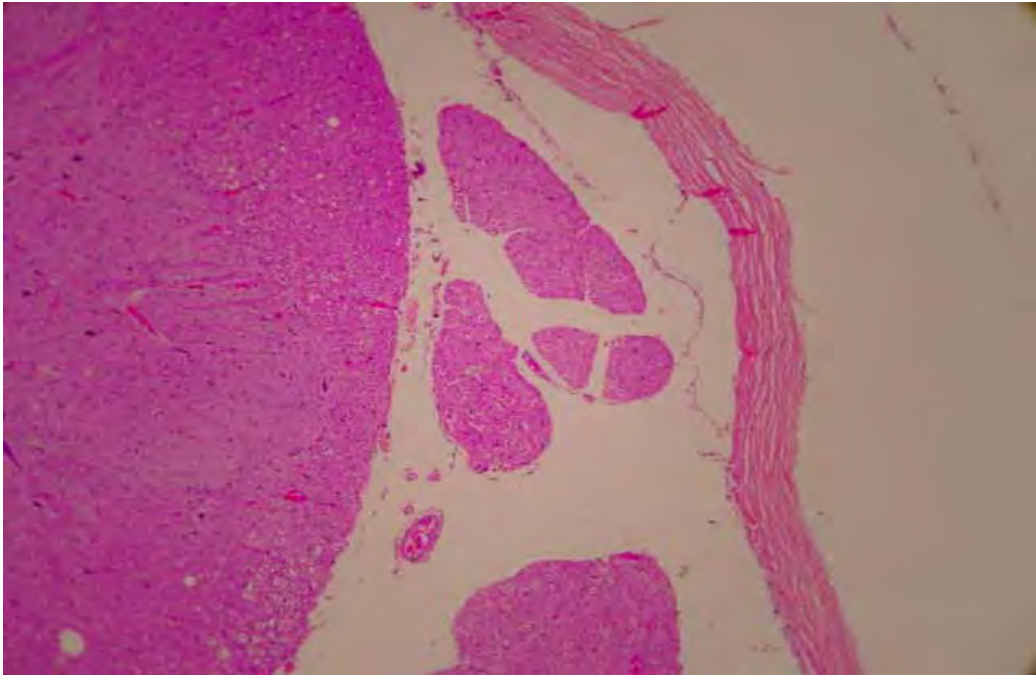


Figura 1 - Tecido nervoso, vasos sangüíneos e meninges normais. H E 100x.

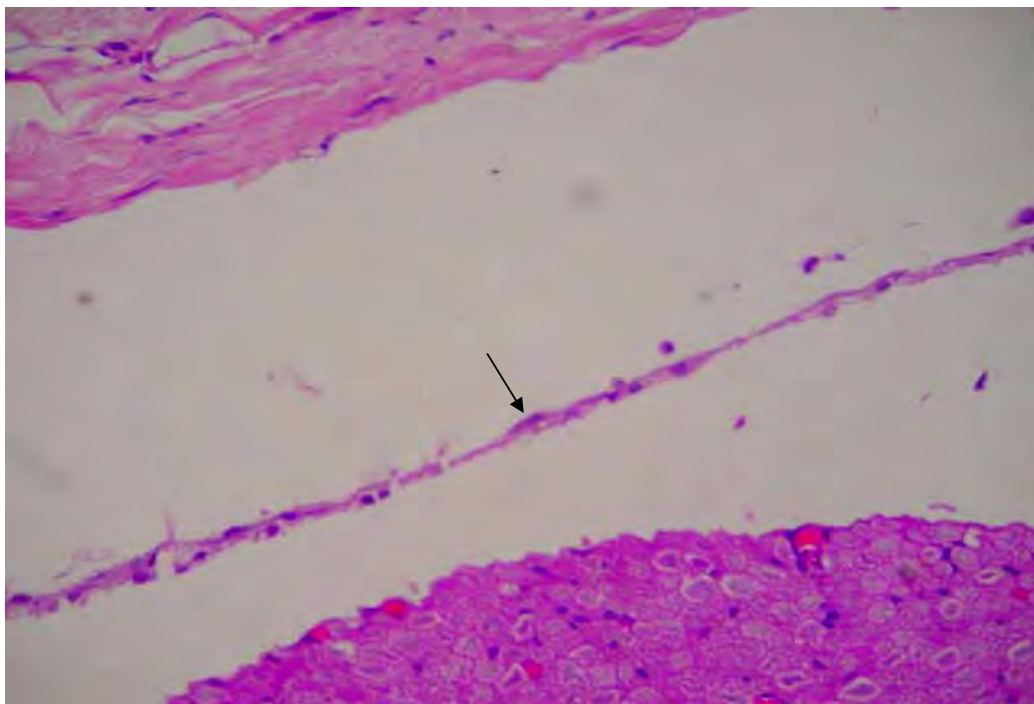


Figura 2 - Tecido nervoso e meninges normais, com destaque para a aracnóide (seta). H E 400x.

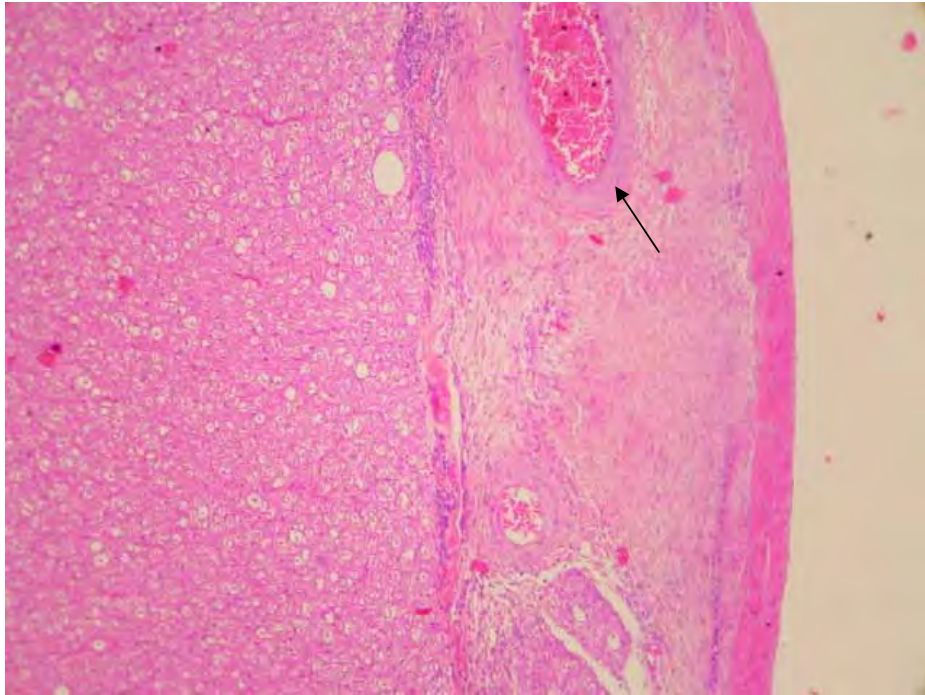


Figura 3 - Tecido nervoso normal, vasos sanguíneos espessados (seta) e espessamento fibroso e aderência das meninges. H E 400x.

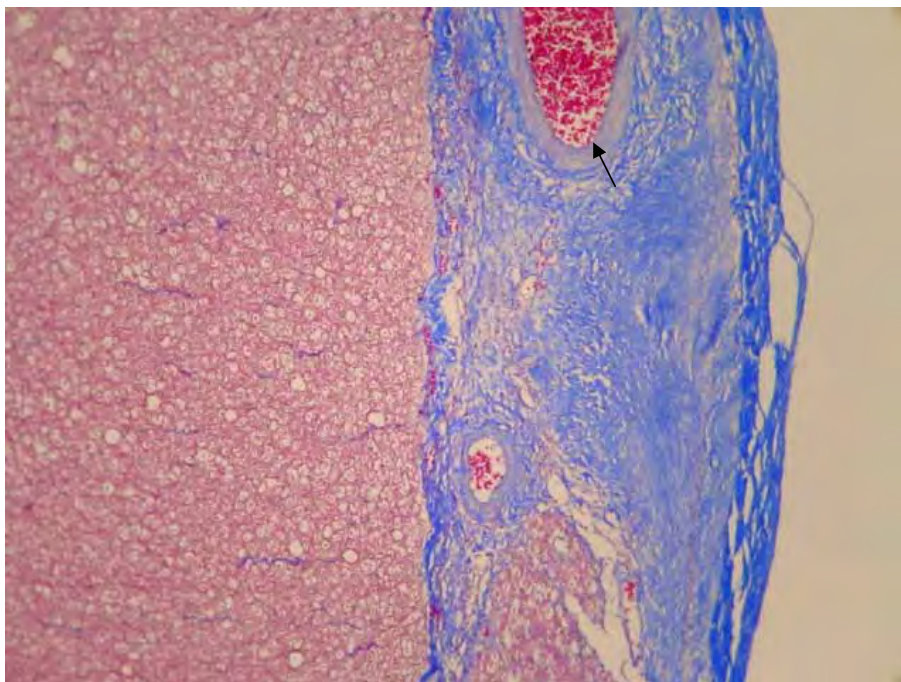


Figura 4 - Tecido nervoso normal, vasos sangüíneos espessados (seta) e espessamento fibroso e aderência das meninges. Tricrômico de Masson 400x.

4 Discussão

4.1 *Discussão da Metodologia*

4.1.1 Animal

O cão foi selecionado para este experimento, como modelo animal, por ser de fácil manuseio. Diversos trabalhos de pesquisa relacionados à toxicidade dos anestésicos locais (Vianna, 1985, Ganem, et al., 1996, Ganem et al., 1998, Ganem et al., 2002, Ganem et al., 2003) e à ação de antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais sobre o tecido medular (Ganem et al., 2000, Barros, 2005, Lima, 2008) foram desenvolvidos em cães, no laboratório de pesquisa experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, com bons resultados.

Outros autores, anteriormente, como Lundy et al., 1933, que administraram diversos volumes e concentrações de procaína, e Ravindran et al., 1982, que estudaram os efeitos da clorprocaína e da bupivacaína sobre a medula espinhal, utilizaram o cão como modelo animal para pesquisa. Feldman e Corvino em 1981, cuja pesquisa foi realizada com implantação crônica de cateter no espaço subaracnóideo de cães e que teve por finalidade avaliar a duração do bloqueio anestésico com diferentes anestésicos locais, também encontraram boa correlação entre os resultados obtidos em sua pesquisa e aqueles observados em seres humanos, ressaltando a boa correlação entre as espécies.

A anatomia desses animais é propícia para a realização da punção subaracnóidea, pela facilidade da execução da técnica e pelos riscos reduzidos de se introduzir anestésico local no tecido nervoso (Figura 8, Figura 9, Figura 10).

A coluna vertebral do cão é constituída por sete vértebras cervicais (C), treze torácicas (T), sete lombares (L), três sacrais fundidas (S) e cinco caudais ou coccígeas (Cd). Os segmentos da medula espinhal, suas raízes e seus nervos são designados numericamente de acordo com a região por eles inervada (Figura 11).

Existem duas regiões nas quais o diâmetro relativo da medula espinhal aumenta e elas se localizam onde surgem os nervos das patas. A primeira constitui a intumescência cervical (envolvendo parte de C6 e T1 e os segmentos C7 e C8) e a segunda, a intumescência sacral (compreendendo parte de L5 e S1 e os segmentos L6 e L7). Em posição caudal à intumescência sacral, a medula afila-se e prolonga-se em forma de cone, o *connus medullaris*, onde se encontram os demais segmentos sacrais e coccígeos. Aproximadamente um centímetro no sentido distal ao quinto segmento caudal, a medula espinhal termina como *fillum terminale*, um filamento de células gliais e ependimais. O saco dural e, como conseqüência, o espaço subaracnóideo estendem-se dois centímetros além do final da medula espinhal (Figura 10). As raízes sacrais e coccígeas são coletivamente chamadas de cauda eqüina. No cão, grande porção da cauda eqüina situa-se abaixo do saco dural.

A punção subaracnóidea foi realizada na porção distal da região na qual se encontra o cone medular ou na região do filo terminal (Fletcher, 1979).

Acredita-se que, respeitando as diferenças anatômicas próprias de cada espécie, o cão apresenta-se como bom animal a ser utilizado no estudo da neurotoxicidade de anestésicos locais administrados no espaço subaracnóideo.

4.1.2 Amitriptilina

Os antidepressivos tricíclicos têm seu emprego consagrado como adjuvantes no tratamento da dor (Lynch, 2001) e são muito utilizados na abordagem terapêutica das síndromes dolorosas crônicas. Contudo, há limitações na sua utilização. Por desencadearem efeitos anticolinérgicos, não são tolerados por muitos pacientes, são contra-indicados na presença de glaucoma de ângulo fechado e de sintomas prostáticos, e devem ser empregados com cautela na população idosa pela sua capacidade de desencadear arritmias (McQuay, et al., 1996).

O mecanismo de ação clássico dos tricíclicos é a inibição da recaptação dos neurotransmissores noradrenalina e serotonina pelos neurônios pré-sinápticos (Saarto & Wiffen, 2005) (Figura 5), entretanto, apresentam outros mecanismos de ação envolvendo múltiplos locais de atuação.

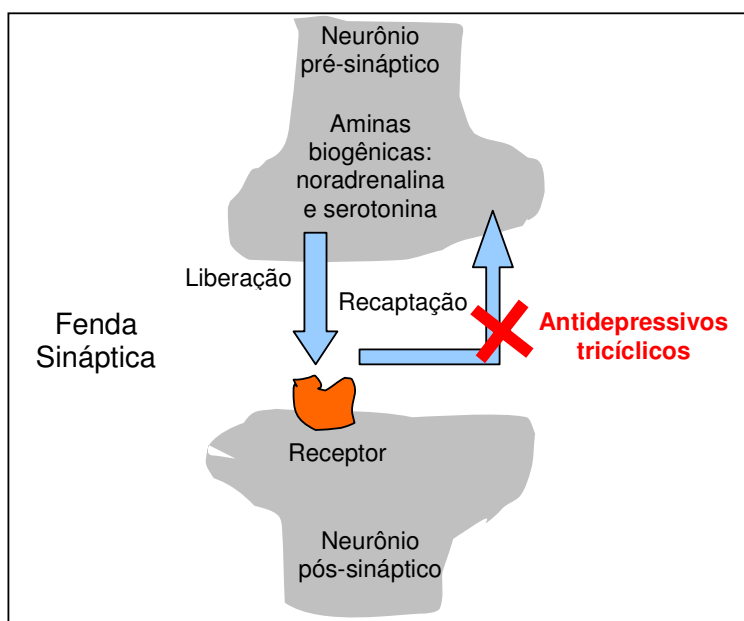


Figura 5 – Mecanismo de ação clássico dos antidepressivos tricíclicos.

Eles apresentam similaridades estruturais com os anestésicos locais (Figura 6). Ambos possuem porção hidrofóbica (geralmente um único anel no caso dos anestésicos locais e uma estrutura tricíclica no caso dos antidepressivos) ligada por uma cadeia intermediária linear (amida nos anestésicos locais e hidrocarboneto nos antidepressivos) a um grupamento amina (Strumper & Durieux, 2004). Além da estrutura química semelhante a dos anestésicos locais, os antidepressivos tricíclicos demonstraram bloquear o influxo de sódio induzido pela veratridina (neurotoxina que causa ativação permanente dos canais de sódio) em células corticais de ratos (Deffois et al., 1996). Em estudo *in vitro* com células adrenais bovinas cromofinas e em células do gânglio da raiz dorsal de ratos, este achado foi confirmado (Pancrazio, et al., 1998).

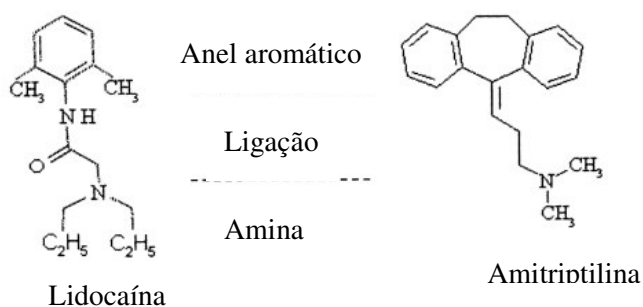


Figura 6 – Semelhanças estruturais entre anestésicos locais e antidepressivos.

Existem evidências sugerindo que a amitriptilina (Figura 7), o protótipo dos antidepressivos tricíclicos, possui ação bloqueadora em receptores α_2 adrenérgicos, nicotínicos, muscarínicos, n-metil-d-aspartato (NMDA) (Watanabe et al., 1993, Eisenach & Gebhart, 1995a), ácido gama aminobutírico b (GABA_b) (McCarson et al., 2005) e histaminérgicos (Sawynok & Reid, 2003), além de interagir com receptores opióides (Hamon et al., 1987, Gray, et al., 1998) e da adenosina A1 (Sawynok, et al., 1999, Sawynok et al., 2005).

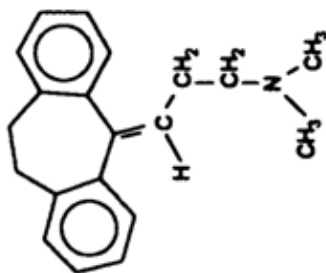


Figura 7– Fórmula Molecular da Amitriptilina.

Estudos demonstraram que a amitriptilina também possui ação antiinflamatória (Xia, et al., 1996b, Yaron, et al., 1999, Kubera et al., 2000, Leduc et al., 2002, Obuchowicz et al., 2006, Tai et al., 2006), atuando em diferentes receptores no sistema nervoso central e periférico (Quadro 5).

Quadro 5 – Ação antiinflamatória da amitriptilina

EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO DA AMITRIPTILINA

- Eixo pituitário-adrenal
inibição da liberação de óxido nítrico (Yaron et al., 1999)
- Células Sinoviais
inibição da produção de prostaglandina E2 (Yaron, et al., 1999)
inibição da secreção de ácido hialurônico (Yaron, et al., 1999)
- Monócitos
inibição da secreção de interleucina 6 (Xia et al., 1996b)
inibição da secreção de interleucina 1 β (Xia, et al., 1996b)
inibição da secreção de fator de necrose tumoral α (Xia, et al., 1996b)
- Células T
inibição da secreção de interferon γ (Xia, et al., 1996b)
inibição da secreção de interleucina 2 (Merskey & Bogduk, 1994, Xia, et al., 1996b)

Todos esses receptores desempenham função importante na fisiologia da transmissão dolorosa e quando bloqueados conferem analgesia em diferentes síndromes dolorosas. Portanto a amitriptilina possui grande potencial como medicação coadjuvante no tratamento da dor, além de apresentar similaridades com os anestésicos locais.

Em virtude de se buscar o anestésico local ideal, que possua baixa toxicidade e apresente potência elevada, muito se tem investigado sobre a propriedade anestésica local da amitriptilina. Pelo fato de este fármaco apresentar alta lipossolubilidade, supõe-se que essa propriedade possa interferir tanto na sua distribuição como na sua dispersão e fixação quando administrado próximo a tecido neural (Eisenach, 1996, Pancrazio, et al., 1998).

Estudo avaliando o bloqueio de nervo ciático de ratos (Gerner et al., 2001) demonstrou que a amitriptilina apresenta efeitos antinociceptivo e bloqueador de canal de sódio de 4,7 a 10,6 vezes mais potentes que os da bupivacaína. Apesar disso, quando injetada pela via venosa, necessita de doses superiores à da bupivacaína para desencadear toxicidade tanto para o sistema cardiovascular como para o sistema nervoso central (Srinivasa et al., 2003).

Estudos *in vivo* sobre a ação da amitriptilina e do seu derivado, a N-feniletil amitriptilina, em nervo ciático de ratos, nos quais foram avaliadas diferentes concentrações deste fármaco, constataram ausência de déficit neurológico em concentrações abaixo de $15,4 \text{ mmol.l}^{-1}$ (Gerner et al., 2003a, Estebe & Myers, 2004, Barnet et al., 2005, Gerner et al., 2005). Já em concentrações superiores a 50 mmol.l^{-1} , esses autores encontraram déficits neurológicos permanentes de grau variável. A histologia do tecido nervoso medular desses animais, avaliada por meio de microscopia óptica, constatou edema subperineural e perivascular 24 horas após a administração do fármaco e degeneração Walleriana progressiva nos cortes histológicos realizados 72 horas e sete dias após a utilização do mesmo (Estebe & Myers, 2004). Nesses estudos, foram avaliados apenas os animais que apresentaram déficits neurológicos ou naqueles nos quais houve retardo na recuperação do bloqueio motor, o que difere da presente pesquisa, na qual nenhum animal apresentou déficit neurológico mesmo com graus variáveis de alteração histológica das meninges.

Quando administrada pela via subaracnóidea, em ratos, a amitriptilina potencializou os efeitos analgésicos da morfina endovenosa ao estímulo nociceptivo (Eisenach & Gebhart, 1995b), o que não foi observado quando administrada pela via intraperitoneal. Como a analgesia, esse efeito não foi alterado pela administração subaracnóidea da carbamilcolina (agonista colinérgico), sugerindo que não houve bloqueio muscarínico, o que reforça a hipótese de que seu efeito se dê por inibição da recaptação de monoaminas espinhais nas vias bulbo-espinhais inibitórias descendentes, noradrenérgicas e serotoninérgicas (Eisenach & Gebhart, 1995b). Neste estudo não foi avaliada a neurotoxicidade do fármaco.

Em modelo experimental em ratos no qual se estudou a hiperalgisia inflamatória induzida pela morfina, a amitriptilina apresentou efeito anti-hiperalgésico via antagonismo do NMDA. O mecanismo de ação se deve ao bloqueio do aumento do cálcio intracelular nas células granulares cerebelares e neurônios corticais, além de ser um antagonista efetivo da plasticidade neuronal mediada pelo NMDA, efeito semelhante ao da cetamina (Eisenach & Gebhart, 1995a).

Foi descrito que a estimulação excessiva de receptores NMDA é uma das vias finais comuns no desenvolvimento de toxicidade neuronal. Estudos anteriores já demonstraram que a amitriptilina, em concentrações micromolares mínimas, preveniu a morte celular na exposição ao NMDA (McCaslin, et al., 1992). Quando administrada no espaço subaracnóideo, não apresentou efeito analgésico em animais normais, mas reverteu hiperalgisia térmica ocasionada pela injeção intraplantar de caragenina. Não foi observada

reversão da analgesia na presença da fentolamina (agonista alfa adrenérgico não seletivo) e metisergida (antagonista de receptores serotoninérgicos), sugerindo que a inibição da recaptação das monoaminas não seja a maior responsável pela anti-hiperalgesia (Eisenach & Gebhart, 1995a, b).

Quando aplicada perifericamente, a amitriptilina demonstrou prevenir a expressão c-fos (protoncogene ligado ao processo de sensibilização central e desenvolvimento de dores crônicas) na medula após a injeção de formalina (Heughan et al., 2002). Desta forma a amitriptilina demonstrou-se como promissora no tratamento das síndromes álgicas crônicas.

Estudo em ovelhas (Cerdeira et al., 1997), utilizando a amitriptilina pela via subaracnóidea, em doses que variaram de 5 a 20 mmol.l⁻¹, mostrou efeito antinociceptivo, semelhante aos dos anestésicos locais. Este efeito, entretanto, apresentou maior seletividade para o bloqueio sensitivo, na dependência da dose utilizada. O bloqueio motor foi de curta duração e apenas para doses superiores a 10 mmol.l⁻¹. Nesta pesquisa não foi avaliada a neurotoxicidade da droga por meio de estudos histológicos.

Pela possibilidade de a amitriptilina ser utilizada como anestésico local, nos últimos quatro anos tem sido investigada a toxicidade da amitriptilina nos diferentes tecidos.

Barnet et al, 2005, em estudo envolvendo pele, tecido celular subcutâneo, músculo e nervo ciático de ratos, observaram lesão tecidual significativa na concentração de 5 mmol.l⁻¹ em pele, tecido celular subcutâneo e musculatura. Observaram toxicidade mais expressiva a partir da concentração de 15.4 mmol, esse efeito foi mais tóxico que o da bupivacaína.

Gerner et al, 2003, observaram que a amitriptilina transdérmica (10, 50 e 100 mmol/l⁻¹) produziu analgesia na região aplicada, comprovada à estimulação com filamento de von Frey, estimulação térmica e elétrica. Os pesquisadores observaram, irritação frustra, dose dependente, na pele logo após a retirada do *patch*, que desapareceu após algumas horas.

A amina quaternária da amitriptilina, quando utilizada em baixas doses (2,5 e 5 mmol) foi considerada mais potente, porém tóxica ao nervo ciático de rato na dose de 5 mmol (Gerner et al., 2002). O estudo questiona a possibilidade de injeção inadvertida intraneural.

Em pesquisa *in vitro* em cultura de células neurais a amitriptilina induziu apoptose em linfócitos, alterou a função dos neutrófilos (Sacerdote et al., 1994, Xia et al., 1996a, Xia et al., 1999), e foi tóxica aos neurônios em concentrações superiores a 50 mmol.l⁻¹ (Slamon & Pentreath, 2000).

Quando o fármaco foi utilizado no bloqueio do nervo ulnar em seres humanos (Fridrich et al., 2004), em doses de 5, 10 e 20 mmol⁻¹, foi menos eficaz que a bupivacaína em abolir a dor, mas não determinou déficit neurológico ou toxicidade local, possivelmente pela espessa camada protetora que envolve os tecidos nervosos dos seres humanos, quando comparada com a dos ratos.

Pelo potencial da amitriptilina no tratamento da dor por seus múltiplos mecanismos de ação, seu possível efeito neuroprotetor e suas similaridades aos anestésicos locais, o uso pela via peridural ou subaracnóidea poderia representar grande avanço no tratamento de diversas síndromes algicas, especialmente a dor neuropática. Na literatura, entretanto, não se

observa dados suficientes sobre a segurança do uso deste fármaco no neuroeixo no que se refere à toxicidade à medula e às meninges.

4.1.3 Dose administrada

Optou-se por pesquisar neurotoxicidade da amitriptilina nas doses de 5 e 10 mmol.l⁻¹, pois em estudos experimentais prévios (Eisenach & Gebhart, 1995a, b, Cerda, et al., 1997, Gerner, et al., 2003a) estas doses demonstraram induzir bloqueio motor e analgesia, sem que se tenha observado seqüelas neurológicas até sete dias após sua administração subaracnóidea. Nestes estudos não foram avaliadas a histologia da medula e das meninges dos animais.

4.2 Discussão dos Resultados

4.2.1 Resultados Clínicos

Não foram observadas, em nenhum dos cães incluídos no estudo, quaisquer alterações de sensibilidade dolorosa, de força muscular ou de tônus do esfínter anal durante o período de 21 dias de cativeiro após a recuperação do bloqueio anestésico. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Cerda (1997) em estudo avaliando a amitriptilina pela via subaracnóidea em ovelhas e Sudoh (2004) avaliando diferentes doses de amitriptilina pela via subaracnóidea em ratos.

Nem sempre as alterações histológicas determinam alterações clínicas correspondentes. Joseph e Denson, 1958, administraram anestésico

local associado a diferentes detergentes, pela via subaracnóidea de 18 macacos, e constataram que sete animais, avaliados por períodos que variaram de três a quatorze meses, apresentaram aracnoidite. Destes, dois apresentaram lesão histológica intensa e apenas um desenvolveu paraplegia.

Também, Rosen et al., 1983, ao injetarem grandes volumes de anestésicos no espaço subaracnóideo de ovelhas, observaram que o animal que apresentou foco de desmielinização à microscopia óptica não apresentou quaisquer alterações clínicas, apesar de esta lesão ser classificada como de intensidade moderada.

Resultados similares foram observados por Ready et al., 1985, com o objetivo de estudar o potencial tóxico da administração subaracnóidea de diversos anestésicos locais, em várias concentrações, sobre a medula espinhal e as raízes da cauda eqüina de coelhos. Os autores não encontraram correlação entre a lesão do tecido nervoso e a extensão ou o tipo de perda funcional. Alguns animais com função neurológica normal apresentaram alterações histológicas intensas nas raízes da cauda eqüina.

Ganem et al., 1996, estudando a neurotoxicidade de anestésicos locais em cães, utilizando a mesma metodologia desta pesquisa, não encontraram correlação entre alterações clínicas e histológicas, quando as lesões eram discretas.

Onde e como os agentes neurotóxicos modificam as células do sistema nervoso são questões de interesse considerável porque o funcionamento do sistema nervoso central (SNC) como um todo depende das interações de diversas de suas partes. No SNC, se há interferência em alguns

elementos estruturais, ela pode ser reversível, porém lesões de neurônios costumam ser irreversíveis. Além da adaptação plástica por outros neurônios, a ausência de regeneração central impede o retorno da função celular após a morte da célula (Myers & Sommer, 1993). A morte celular não é necessariamente obrigatória para que existam alterações funcionais, porque reações tóxicas em qualquer população de células ou receptores podem influenciar a função neurológica (Hurst, 1955).

Sabe-se que, após injeção de várias substâncias irritantes, podem-se observar muito precocemente alterações histológicas. Estas dependem do agente e da quantidade administrada, assim determinariam alterações clínicas agudas transitórias. Entretanto, alterações clínicas crônicas e definitivas só são observadas após período de latência variável (Hurst, 1955).

A aracnoidite adesiva desenvolve-se de maneira lenta e progressiva, de forma que sintomatologia pode-se tornar perceptível apenas após períodos variáveis de evolução de semanas a meses (Woods & Franklin, 1951).

4.2.2 Resultados histológicos

Nos animais pertencentes ao grupo 1, aos quais foi administrada solução fisiológica pela via subaracnóidea, não foram observadas alterações histológicas na medula espinhal e nas meninges, à microscopia óptica. A finalidade deste grupo foi avaliar as possíveis alterações que a punção subaracnóidea e a introdução dos volumes de solução desencadeariam sobre o tecido nervoso.

Em modelos experimentais, cujo objetivo é estudar as possíveis alterações que soluções introduzidas no espaço subaracnóideo determinam sobre o tecido nervoso e as meninges, é importante que seja excluída a possibilidade de a punção subaracnóidea ser fator determinante de lesões. Como exemplos podemos citar aquelas conseqüentes ao trauma desencadeado pela agulha utilizada para realização da punção e aquelas determinadas pela administração de soluções no interior de uma raiz nervosa.

A técnica utilizada para realização da punção subaracnóidea neste estudo foi anteriormente empregada para a pesquisa dos efeitos que diversas soluções determinariam sobre o tecido medular e as meninges, em cães. Nestes experimentos anteriores, injetou-se, no espaço subaracnóideo, um mililitro de solução de glicose na concentração de 10% (Ganem, et al., 1996), um mililitro de solução fisiológica 0,9% (Barros, 2005, Lima, 2008, Rojas, 2008) e um mililitro de água destilada (Ganem, et al., 2000) não foram observadas alterações no tecido nervoso e nas meninges.

Está descrito na literatura que a injeção de 0,05 mililitro de solução fisiológica no interior dos fascículos nervosos foi suficiente para degenerar os axônios de nervos ciáticos de coelhos (Selander et al., 1979). O trauma desencadeado pela injeção intraneural da solução foi o responsável pela alteração observada.

Esses resultados vêm demonstrar que a técnica selecionada para a realização da punção não foi fator que determinou as alterações nas meninges. Desta forma, pode-se assegurar que a técnica de punção não é responsável

pelas alterações histológicas observadas nos animais que receberam amitriptilina nas duas diferentes doses utilizadas.

A avaliação histológica dos cortes do tecido nervoso e das meninges de 13 dos 14 animais pertencentes aos grupos 2 e 3, os quais receberam amitriptilina na dose de 5 ou 10 mmol.l⁻¹, respectivamente, mostrou infiltrado inflamatório com neutrófilos, macrófagos e linfócitos entre a pia-máter e a aracnóide e entre esta e a dura-máter, além de espessamento fibroso da parede dos vasos. Apesar de estas lesões serem clinicamente assintomáticas no momento do sacrifício, este tipo de lesão tende a evoluir até desenvolvimento de déficit motor.

Ainda que existam pesquisas avaliando a toxicidade direta da amitriptilina sobre o tecido nervoso, seja em nervo ciático isolado de ratos (Gerner, et al., 2003a), seja simulando a administração como bloqueio de nervo periférico (Estebe et al., 2004), ou ainda pela administração pela via subaracnóidea (Cerdeira, et al., 1997), a amitriptilina em pequenas doses não desencadeou lesão neurológica clínica ou histológica.

Sudoh et al., 2004, após administração subaracnóidea de diferentes doses de amitriptilina avaliaram as meninges de ratos e observaram presença de meningite química e degeneração axonal focal nas doses de 50mmol.l⁻¹ (amitriptilina 1,6%), porém na dose de 15,9 mmol.l⁻¹ (amitriptilina 0,5%) não houve qualquer alteração histológica. Neste estudo, o fármaco foi administrado lentamente (33 µl.minuto⁻¹) e foram avaliados histologicamente apenas os animais que apresentaram algum déficit motor após sete dias de observação. Não foi avaliada a toxicidade de baixas doses do fármaco.

A aracnoidite foi reconhecida como doença em 1909 por Horsley (Rice et al., 2004), tendo suas alterações histológicas descritas por Burton, 1978. Estas alterações foram reconhecidas como processo inflamatório progressivo, inicialmente caracterizado por radiculite com inflamação, envolvendo a pia-máter e aracnóide, com edema da raiz. Nesta fase, colunas de colágeno começam a se formar entre as raízes nervosas e as leptomeninges.

A verdadeira aracnoidite ocorre mais tardiamente, aparecendo depósito de colágeno, diminuição do edema das raízes nervosas e aderências destas, umas às outras (Burton, 1978). Segue-se a aracnoidite adesiva, após a resolução do processo inflamatório, com deposição densa de colágeno e conseqüente estrangulamento das raízes, que acabam por se atrofiarem (Burton, 1978). Arterite é observada neste processo, não se sabendo se é causa ou conseqüência do mesmo (Weston-Hurst, 1955).

Diversas situações clínicas dão origem à aracnoidite adesiva. A lesão histológica que a caracteriza é a fibrose da aracnóide acompanhada por outras alterações que dependem da causa desencadeante do processo. Na meningite pneumocócica, por exemplo, grandes quantidades de polissacarídeo capsular do pneumococo produzem exsudato gelatinoso que estimula a fibrose da aracnóide, resultando em aracnoidite adesiva (Girolami et al., 1996).

Uma outra forma curiosa de aracnoidite, denominada de Horrax, é crônica serosa difusa, que pode simular a sintomatologia de um tumor cerebelar, tendo sido descrita em 1893. Nesta, ocorre espessamento da aracnóide, formando grandes cisternas posteriores sobre o cerebelo.

Histologicamente, a aracnóide apresenta-se com processo inflamatório crônico, com espessamento e obstrução ao livre trânsito do líquido (Anderson, 1967).

A aracnoidite pode-se manifestar como complicação de meningites bacterianas, em crianças, e caracteriza-se pela presença de células inflamatórias. Em fase aguda, existe exsudato predominantemente rico em leucócitos polimorfonucleares (Bresolin, 1996). As bactérias são visíveis, tanto livres no exsudato restrito ao espaço subaracnóideo, como dentro de polimorfonucleares e macrófagos (Bresolin, 1996).

A aracnoidite crônica resulta em estrangulamento doloroso e fibrótico de raízes nervosas, mais comumente observado em regiões sacral e tóraco-lombar (Esiri, 1992). Este processo é acompanhado por calcificações e pode ser o resultado da introdução de contrastes radiopacos no espaço subaracnóideo para realização de mielografia (Adams et al., 1988, Esiri, 1992). A aracnoidite pode ser também de causa idiopática, ou secundária a traumas repetidos ou a procedimentos cirúrgicos (Adams, et al., 1988, Esiri, 1992).

Alguns conservantes como o polietilenoglicol, cloreto de benzetônio e clorbutanol têm sido freqüentemente associados à aracnoidite adesiva (Benzon, 1986, Nelson et al., 1998, Stotz et al., 1999, Hetherington & Dooley, 2000). O metilparabeno e propilparabeno têm demonstrado maior perfil de segurança, entretanto discute-se esta segurança quando da necessidade de se administrar doses repetidas de fármacos que contenham o conservante (Rowlison, 1993, Eisenach, 1996, Eisenach et al., 1997, Gurun et al., 1997).

Os preservativos da amitriptilina são o metilparabeno e o propilparabeno. Neste estudo, para excluir a possibilidade de que os

conservantes da amitriptilina pudessem desenvolver possíveis alterações histológicas, optou-se por utilizar o fármaco puro, sem conservantes.

A toxicidade da amitriptilina sobre o tecido nervoso apesar de pesquisada ainda não está bem estabelecida. Sabe-se que a amitriptilina possui elevado coeficiente de partição (logP). Seu logP^o calculado é de 4,95 comparado com o logP^o da bupivacaína, de 3,41. Estudos sugerem que a lipossolubilidade do anestésico local interfere na sua fixação e dispersão (Tetko et al., 2001) influenciando tanto a extensão como o grau do bloqueio estabelecido. Como a amitriptilina apresenta um valor de logP elevado (Baldessarini, 1995), supõe-se que ela se distribua mal em ambiente aquoso, sendo absorvida com maior facilidade pelo tecido adiposo, pelas membranas celulares, pelas organelas e outras proteínas. Mesmo quando administrada pela via parenteral, a amitriptilina encontra-se em grande proporção ligada a proteínas plasmáticas (95%) (Baldessarini, 1995). Essa lipossolubilidade confere à amitriptilina a propriedade de ultrapassar a barreira hematoencefálica quando administrada pela via parenteral (Uhr et al., 2000, Grauer & Uhr, 2004).

Estudo recente demonstrou que a neurotoxicidade da amitriptilina é semelhante à toxicidade dos anestésicos locais quando utilizados em alta concentração (Kitagawa et al., 2006). Tanto os anestésicos locais como os antidepressivos tricíclicos apresentam propriedades ambifílicas, ou seja, porção hidrofílicas e hidrofóbicas.

Quando estes fármacos atingem concentração considerada crítica em ambiente aquoso, a porção hidrofílica alinha-se à porção hidrofóbica. Esta

sobreposição cria um agregado molecular que gera repulsão das moléculas de água. López et al., 1999, observaram, à microscopia eletrônica, imagens diretas da ruptura das membranas induzidas por substância ambifílica. Este mecanismo é classicamente aceito como parte da fisiologia do processo de hemólise (Pethica & Schulman, 1953, Seeman, 1966, Shalel et al., 2002) e como possível desencadeador da neurotoxicidade pelos anestésicos locais (Kitagawa et al., 2004).

O presente estudo mostrou que concentrações de $5\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ foram capazes de determinar toxicidade meníngea, o que vem demonstrar que a margem de segurança terapêutica da amitriptilina é estreita, ou seja, a concentração que determina efeito clínico é muito próxima daquela que induz lesão, demonstrando não ser segura para ser utilizada no espaço subaracnóideo.

5 Conclusão

A amitriptilina, nas doses de 5 e 10 mmol.l⁻¹ administrada pela via subaracnóidea determinou alterações histológicas nas meninges, mas não na medula de cães.

6 Referências

Adams J, Graham D Harriman D. Bacterial infections. Adams J, Graham D and Harriman D, editors. New York: Churchill Livingstone; 1988.

Ahmad M Goucke CR. Management strategies for the treatment of neuropathic pain in the elderly. *Drugs Aging* 2002;19:929-45.

Anderson W. The cranium and it's contents. In: Anderson W, editor. *Boyd's - Pathology for the Surgeon*. 8 ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1967. p. 535-94.

Attal N, Gaude V, Brasseur L, Dupuy M, Guirimand F, Parker F, et al. Intravenous lidocaine in central pain: a double-blind, placebo-controlled, psychophysical study. *Neurology* 2000;54:564-74.

Baldessarini R. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R and Gilman A, editors. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York, NY: McGraw-Hill; 1995. p. 431-59.

Ballantyne J, Fishman S, Abdi S Massachusetts General Hospital. *The Massachusetts General Hospital handbook of pain management*. 2nd ed. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins; 2002.

Barnet CS, Louis DN Kohane DS. Tissue injury from tricyclic antidepressants used as local anesthetics. *Anesth Analg* 2005;101:1838-43.

Barros GAM. Efeitos determinados pela betametasona, administrada pela via subaracnóidea, sobre a medula espinhal e as meninges: estudo experimental em cães. [Tese]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina da UNESP; 2005.

Basbaum A, Bushnell C Devor M. Pain: Basic Mechanisms. In: Flor H and IASP Scientific Program Committee., editors. *Pain 2005: an updated review : refresher course syllabus*. Seattle: IASP Press; 2005. p. 3-9.

Benzon HT. Epidural steroid injections for low back pain and lumbosacral radiculopathy. *Pain* 1986;24:277-95.

Biegon A Samuel D. Interaction of tricyclic antidepressants with opiate receptors. *Biochem Pharmacol* 1980;29:460-2.

Bogduk N. Epidural Use of Steroids in the Management of Back Pain and sciatica of spinal origin. Canberra; 1994 [updated 1994; cited 2006 08/ 08/]; Disponível em: http://www.nhmrc.gov.au/publications/_files/withdrawn/hpr1.pdf.

Bowsher D. The lifetime occurrence of Herpes zoster and prevalence of post-herpetic neuralgia: A retrospective survey in an elderly population. *Eur J Pain* 1999;3:335-42.

Bresolin A. Meningites bacterianas agudas. In: Diament A and Cypel S, editors. *Neurologia Infantil*. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 1996. p. 817-43.

Bryson HM Wilde MI. Amitriptyline. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in chronic pain states. *Drugs Aging* 1996;8:459-76.

- Burton CV. Lumbosacral arachnoiditis. *Spine* 1978;3:24-30.
- Cai Z McCaslin PP. Amitriptyline, desipramine, cyproheptadine and carbamazepine, in concentrations used therapeutically, reduce kainate- and N-methyl-D-aspartate-induced intracellular Ca²⁺ levels in neuronal culture. *Eur J Pharmacol* 1992;219:53-7.
- Cerda SE, Tong C, Deal DD Eisenach JC. A physiologic assessment of intrathecal amitriptyline in sheep. *Anesthesiology* 1997;86:1094-103.
- Courville CB. Untoward effects of spinal anesthesia on the spinal cord and its investments. *Curr Res Anesth Analg* 1955;34:313-33.
- Deffois A, Fage D Carter C. Inhibition of synaptosomal veratridine-induced sodium influx by antidepressants and neuroleptics used in chronic pain. *Neurosci Lett* 1996;220:117-20.
- Devor M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. *J Pain* 2006;7:S3-S12.
- Dirks J, Fabricius P, Petersen KL, Rowbotham MC Dahl JB. The effect of systemic lidocaine on pain and secondary hyperalgesia associated with the heat/capsaicin sensitization model in healthy volunteers. *Anesth Analg* 2000;91:967-72.
- Eisenach JC. Three novel spinal analgesics: clonidine, neostigmine, amitriptyline. *Reg Anesth* 1996;21:S81-3.
- Eisenach JC Gebhart GF. Intrathecal amitriptyline acts as an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in the presence of inflammatory hyperalgesia in rats. *Anesthesiology* 1995a;83:1046-54.
- Eisenach JC Gebhart GF. Intrathecal amitriptyline. Antinociceptive interactions with intravenous morphine and intrathecal clonidine, neostigmine, and carbamylcholine in rats. *Anesthesiology* 1995b;83:1036-45.
- Eisenach JC, Hood DD Curry R. Phase I human safety assessment of intrathecal neostigmine containing methyl- and propylparabens. *Anesth Analg* 1997;85:842-6.
- Esiri M. The nervous system - Infections. In: McGee J, Isaacson P, Wright N, Dick H and E S, editors. *Oxford Textbook of Pathology*. Oxford: Oxford University; 1992. p. 1825-928.
- Estebe JP, Gentili ME, Le Corre P, Leduc C, Moulinoux JP Ecoffey C. Contralateral effect of amitriptyline and bupivacaine for sciatic nerve block in an animal model of inflammation. *Br J Anaesth* 2004;93:705-9.
- Estebe JP Myers RR. Amitriptyline neurotoxicity: dose-related pathology after topical application to rat sciatic nerve. *Anesthesiology* 2004;100:1519-25.
- European Federation of IASP Chapters. EFIC's declaration on pain as a major health problem, a disease in its own right. 2001 [updated 2001; cited 2006 08/08]; Disponível em: <http://www.efic.org/declarationonpain.html>.

- Farkouh ME, Lang JD Sackett DL. Thrombolytic agents: the science of the art of choosing the better treatment. *Ann Intern Med* 1994;120:886-8.
- Feldman H Covino B. A chronic model for investigation of experimental spinal anesthesia in the dog. *Anesthesiology* 1981;54:148-52.
- Ferrell BA. Pain management. *Clin Geriatr Med* 2000;16:853-74.
- Fletcher T. Spinal cord and meninges. In: Evans HE CG, editor. *Miller's anatomy of the dog*. 2nd ed ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1979. p. 935-71.
- Fridrich P, Eappen S, Jaeger W, Schernhammer E, Zizza AM, Wang GK, et al. Phase Ia and Ib study of amitriptyline for ulnar nerve block in humans: side effects and efficacy. *Anesthesiology* 2004;100:1511-8.
- Ganem EM, Vianna PT Castiglia YMM. Complicações neurológicas determinadas pela anestesia subaracnóidea. *Rev Bras Anestesiol* 2002;52:471-80.
- Ganem EM, Vianna PT, Castiglia YMM, Marques M Vane LA. Neurotoxicity of subarachnoid hyperbaric bupivacaine in dogs. *Reg Anesth Pain Med* 1996;21:234-8.
- Ganem EM, Vianna PT, Marques M Castiglia YM. Efeitos de grandes volumes de lidocaína 2% e lidocaína 2% bicarbonatada sobre a medula espinhal de cães após injeção subaracnóidea. *Rev Bras Anestesiol* 1998;48:S24.
- Ganem EM, Vianna PT, Marques M Castiglia YMM. Effects of different doses of tenoxican on spinal cord and meninge. Experimental study in dogs. *Braz J Anestesiol* 2000;50:60-2.
- Ganem EM, Vianna PT, Marques M, Castiglia YMM Vane LA. Efeitos da administração de grandes volumes de lidocaína a 2% e ropivacaína a 1% sobre a medula espinhal e as meninges. Estudo experimental em cães. *Rev Bras Anestesiol* 2003;53:351-60.
- Gerner P, Haderer AE, Mujtaba M, Sudoh Y, Narang S, Abdi S, et al. Assessment of differential blockade by amitriptyline and its N-methyl derivative in different species by different routes. *Anesthesiology* 2003a;98:1484-90.
- Gerner P, Kao G, Srinivasa V, Narang S Wang GK. Topical amitriptyline in healthy volunteers. *Reg Anesth Pain Med* 2003b;28:289-93.
- Gerner P, Luo SH, Zhuang ZY, Djalali AG, Zizza AM, Myers RR, et al. Differential block of N-propyl derivatives of amitriptyline and doxepin for sciatic nerve block in rats. *Reg Anesth Pain Med* 2005;30:344-50.
- Gerner P, Mujtaba M, Khan M, Sudoh Y, Vlassakov K, Anthony DC, et al. N-phenylethyl amitriptyline in rat sciatic nerve blockade. *Anesthesiology* 2002;96:1435-42.
- Gerner P, Mujtaba M, Sinnott CJ Wang GK. Amitriptyline versus bupivacaine in rat sciatic nerve blockade. *Anesthesiology* 2001;94:661-7.
- Ghelardini C, Galeotti N Bartolini A. Antinociception induced by amitriptyline and imipramine is mediated by alpha2A-adrenoceptors. *Jpn J Pharmacol* 2000;82:130-7.

Girolami U, Frasch M Anthony D. O sistema nervoso. In: Scholen F, Cotran R, Kumar V and Robins S, editors. *Robins - Patologia Estrutural e Funcional*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guababara Koogan; 1996. p. 1171-226.

Grauer MT Uhr M. P-glycoprotein reduces the ability of amitriptyline metabolites to cross the blood brain barrier in mice after a 10-day administration of amitriptyline. *J Psychopharmacol* 2004;18:66-74.

Gray AM, Pache DM Sewell RD. Do alpha2-adrenoceptors play an integral role in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds? *Eur J Pharmacol* 1999;378:161-8.

Gray AM, Spencer PS Sewell RD. The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. *Br J Pharmacol* 1998;124:669-74.

Greene NM. Neurological sequelae of spinal anesthesia. *Anesthesiology* 1961;22:682-98.

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;85:317-23.

Hamon M, Gozlan H, Bourgoin S, Benoliel JJ, Mauborgne A, Taquet H, et al. Opioid receptors and neuropeptides in the CNS in rats treated chronically with amoxapine or amitriptyline. *Neuropharmacology* 1987;26:531-9.

Hansson PT. Neuropathic Pain: Definition, Epidemiology, Classification, and Diagnostic Work-up. In: Justins DM, editor. *Pain 2005 - Updated Review: refresher course syllabus*. 1 ed. Seattle: IASP Press; 2005. p. 406.

Hetherington NJ Dooley MJ. Potential for patient harm from intrathecal administration of preserved solutions. *Med J Aust* 2000;173:141-3.

Heughan CE, Allen GV, Chase TD Sawynok J. Peripheral amitriptyline suppresses formalin-induced Fos expression in the rat spinal cord. *Anesth Analg* 2002;94:427-31.

Horlocker TT Wedel DJ. Density, specific gravity, and baricity of spinal anesthetic solutions at body temperature. *Anesth Analg* 1993;76:1015-8.

Hurst EW. Adhesive arachnoiditis and vascular blockage caused by detergents and other chemical irritants: an experimental study. *J Pathol Bacteriol* 1955;70:167-78.

Isenberg KE Cicero TJ. Possible involvement of opiate receptors in the pharmacological profiles of antidepressant compounds. *Eur J Pharmacol* 1984;103:57-63.

Jaradeh S. Cauda equina syndrome: a neurologist's perspective. *Reg Anesth* 1993;18:S473-80.

Joseph S Denson J. Spinal anesthesia, arachnoiditis, and paraplegia. *J Am Med Assoc* 1958;168:1330-3.

- Kajander KC, Wakisaka S Bennett GJ. Spontaneous discharge originates in the dorsal root ganglion at the onset of a painful peripheral neuropathy in the rat. *Neurosci Lett* 1992;138:225-8.
- Kane RE. Neurologic deficits following epidural or spinal anesthesia. *Anesth Analg* 1981;60:150-61.
- Kanof PD Greengard P. Brain histamine receptors as targets for antidepressant drugs. *Nature* 1978;272:329-33.
- Kitagawa N, Oda M, Nobutaka I, Satoh H, Totoki T Morimoto M. A proposed mechanism for amitriptyline neurotoxicity based on its detergent nature. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;217:100-6.
- Kitagawa N, Oda M Totoki T. Possible mechanism of irreversible nerve injury caused by local anesthetics: detergent properties of local anesthetics and membrane disruption. *Anesthesiology* 2004;100:962-7.
- Kubera M, Holan V, Mathison R Maes M. The effect of repeated amitriptyline and desipramine administration on cytokine release in C57BL/6 mice. *Psychoneuroendocrinology* 2000;25:785-97.
- Lampert A, Hains BC Waxman SG. Upregulation of persistent and ramp sodium current in dorsal horn neurons after spinal cord injury. *Exp Brain Res* 2006.
- Leduc C, Gentili ME, Estebe JP, Le Corre P, Moulinoux JP Ecoffey C. The effect of local anesthetics and amitriptyline on peroxidation in vivo in an inflammatory rat model: preliminary reports. *Anesth Analg* 2002;95:992-6.
- Lima RMe. Efeitos determinados pela metilprednisolona, administrada pela via subaracnóidea, sobre a medula espinhal e as meninges. Estudo experimental em cães [Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2008.
- Lisney SJ Devor M. Afterdischarge and interactions among fibers in damaged peripheral nerve in the rat. *Brain Res* 1987;415:122-36.
- Loeser JD, Butler SD, Chapman CR Turk DC. *Bonica's Management of Pain*. 3a. ed. Loeser JD, editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2000.
- Lopez O, Cocera M, Wehrli E, Parra JL de la Maza A. Solubilization of liposomes by sodium dodecyl sulfate: new mechanism based on the direct formation of mixed micelles. *Arch Biochem Biophys* 1999;367:153-60.
- Lundy J, Essex H Kernohan J. Lesions produced in the spinal cord of dogs by a dose procaine hydrochloride sufficient to cause permanent and fatal paralysis. *J Am Med Assoc* 1933:1546-50.
- Lynch ME. Antidepressants as analgesics: a review of randomized controlled trials. *J Psychiatry Neurosci* 2001;26:30-6.
- Ma W Quirion R. Up-regulation of interleukin-6 induced by prostaglandin E from invading macrophages following nerve injury: an in vivo and in vitro study. *J Neurochem* 2005;93:664-73.
- McCarson KE, Ralya A, Reisman SA Enna SJ. Amitriptyline prevents thermal hyperalgesia and modifications in rat spinal cord GABA(B) receptor expression

and function in an animal model of neuropathic pain. *Biochem Pharmacol* 2005;71:196-202.

McCaslin PP, Yu XZ, Ho IK, Smith TG. Amitriptyline prevents N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced toxicity, does not prevent NMDA-induced elevations of extracellular glutamate, but augments kainate-induced elevations of glutamate. *J Neurochem* 1992;59:401-5.

McQuay HJ, Tramer M, Nye BA, Carroll D, Wiffen PJ, Moore RA. A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain* 1996;68:217-27.

Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2nd ed. Taxonomy. IASP, editor. Seattle: IASP Press; 1994.

Meyer-Rosberg K, Kvarnstrom A, Kinnman E, Gordh T, Nordfors LO, Kristofferson A. Peripheral neuropathic pain--a multidimensional burden for patients. *Eur J Pain* 2001;5:379-89.

Michaelis M, Habler HJ, Jaenig W. Silent afferents: a separate class of primary afferents? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23:99-105.

Myers R, Sommer C. Methodology for spinal neurotoxicity studies. *Reg Anesth Pain Med* 1993;18:S439-47.

Nelson CF, Bronfort G, Evans R, Boline P, Goldsmith C, Anderson AV. The efficacy of spinal manipulation, amitriptyline and the combination of both therapies for the prophylaxis of migraine headache. *J Manipulative Physiol Ther* 1998;21:511-9.

Obuchowicz E, Kowalski J, Labuzek K, Krysiak R, Pendzich J, Herman ZS. Amitriptyline and nortriptyline inhibit interleukin-1 release by rat mixed glial and microglial cell cultures. *Int J Neuropsychopharmacol* 2006;9:27-35.

Pancrazio JJ, Kamatchi GL, Roscoe AK, Lynch C, 3rd. Inhibition of neuronal Na⁺ channels by antidepressant drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;284:208-14.

Pavani NJP, Oliveira AS, Pinheiro MRS, Nobre AR, Moreira Filho L, Eugenio AG. Casuística da Disciplina de Dor Crônica do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. *Rev Bras Anest* 1988;38:347-9.

Pethica BA, Schulman JH. The physical chemistry of haemolysis by surface-active agents. *Biochem J* 1953;53:177-85.

Phillis JW, Wu PH. Adenosine mediates sedative action of various centrally active drugs. *Med Hypotheses* 1982;9:361-7.

Pires SRO, Ganem EM, Marques M M. CYM. Efeitos de concentrações crescentes de lidocaína hiperbárica, administradas no espaço subaracnóideo, sobre a medula espinhal e as meninges. Estudo experimental em cães. *Rev Bras Anestesiol* 2006;56:253-62.

- Ravindran R, Turner M Muller J. Neurologic effects of subarachnoid administration of 2-chloroprocaine-CE, bupivacaine, and low pH normal saline in dogs. *Anesth Analg* 1982;61:279-83.
- Ready L, Plumer M, Haschke R, Austin E Sumi S. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology* 1985;63:364-70.
- Reynolds IJ Miller RJ. Tricyclic antidepressants block N-methyl-D-aspartate receptors: similarities to the action of zinc. *Br J Pharmacol* 1988;95:95-102.
- Rice I, Wee MY Thomson K. Obstetric epidurals and chronic adhesive arachnoiditis. *Br J Anaesth* 2004;92:109-20.
- Rojas AC. Efeitos da administração subaracnóidea de cetamina S(+), sem conservantes, sobre a medula espinhal e as meninges. Estudo experimental no cão. [Mestrado]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2008.
- 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;62:802-8.
- Rowlingson JC. Toxicity of local anesthetic additives. *Reg Anesth* 1993;18:S453-60.
- Saarto T Wiffen PJ. Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD005454.
- Sacerdote P, Bianchi M Panerai AE. Chlorimipramine and nortriptyline but not fluoxetine and fluvoxamine inhibit human polymorphonuclear cell chemotaxis in vitro. *Gen Pharmacol* 1994;25:409-12.
- Sawynok J Reid A. Desipramine potentiates spinal antinociception by 5-hydroxytryptamine, morphine and adenosine. *Pain* 1992;50:113-8.
- Sawynok J Reid A. Peripheral interactions between dextromethorphan, ketamine and amitriptyline on formalin-evoked behaviors and paw edema in rats. *Pain* 2003;102:179-86.
- Sawynok J, Reid AR Esser MJ. Peripheral antinociceptive action of amitriptyline in the rat formalin test: involvement of adenosine. *Pain* 1999;80:45-55.
- Sawynok J, Reid AR, Liu XJ Parkinson FE. Amitriptyline enhances extracellular tissue levels of adenosine in the rat hindpaw and inhibits adenosine uptake. *Eur J Pharmacol* 2005;518:116-22.
- Scadding JW. Treatment of neuropathic pain: historical aspects. *Pain Med* 2004;5:S3-8.
- Schmader KE. Epidemiology and impact on quality of life of postherpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *Clin J Pain* 2002;18:350-4.
- Seeman PM. Membrane stabilization by drugs: tranquilizers, steroids, and anesthetics. *Int Rev Neurobiol* 1966;9:145-221.
- Selander D, Brattsand R, Lundborg G, Nordborg C Olsson Y. Local anesthetics: importance of mode of application, concentration and adrenaline for the

- appearance of nerve lesions. An experimental study of axonal degeneration and barrier damage after intrafascicular injection or topical application of bupivacaine (Marcain). *Acta Anaesthesiol Scand* 1979;23:127-36.
- Shalel S, Streichman S, Marmor A. The mechanism of hemolysis by surfactants: effect of solution composition. *J Colloid Interface Sci* 2002;252:66-76.
- Slamon ND, Pentreath VW. Antioxidant defense against antidepressants in C6 and 1321N1 cells. *Chem Biol Interact* 2000;127:181-99.
- Srinivasa V, Gerner P, Haderer A, Abdi S, Jarolim P, Wang GK. The relative toxicity of amitriptyline, bupivacaine, and levobupivacaine administered as rapid infusions in rats. *Anesth Analg* 2003;97:91-5, table of contents.
- Stotz M, Oehen HP, Gerber H. Histological findings after long-term infusion of intrathecal ketamine for chronic pain: a case report. *J Pain Symptom Manage* 1999;18:223-8.
- Strumper D, Durieux ME. Antidepressants as long-acting local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med* 2004;29:277-85.
- Sudoh Y, Desai SP, Haderer AE, Sudoh S, Gerner P, Anthony DC, et al. Neurologic and histopathologic evaluation after high-volume intrathecal amitriptyline. *Reg Anesth Pain Med* 2004;29:434-40.
- Tai YH, Wang YH, Wang JJ, Tao PL, Tung CS, Wong CS. Amitriptyline suppresses neuroinflammation and up-regulates glutamate transporters in morphine-tolerant rats. *Pain* 2006;124:77-86.
- Takenami T, Yagishita S, Nara Y, Hoka S. Intrathecal mepivacaine and prilocaine are less neurotoxic than lidocaine in a rat intrathecal model. *Reg Anesth Pain Med* 2004;29:446-53.
- Tetko IV, Tanchuk VY, Villa AE. Prediction of n-octanol/water partition coefficients from PHYSPROP database using artificial neural networks and E-state indices. *J Chem Inf Comput Sci* 2001;41:1407-21.
- Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol* 1992;38:397-421.
- Tremont-Lukats IW, Challapalli V, McNicol ED, Lau J, Carr DB. Systemic administration of local anesthetics to relieve neuropathic pain: a systematic review and meta-analysis. *Anesth Analg* 2005;101:1738-49.
- Tremont-Lukats IW, Hutson PR, Backonja MM. A randomized, double-masked, placebo-controlled pilot trial of extended IV lidocaine infusion for relief of ongoing neuropathic pain. *Clin J Pain* 2006;22:266-71.
- Uhr M, Steckler T, Yassouridis A, Holsboer F. Penetration of amitriptyline, but not of fluoxetine, into brain is enhanced in mice with blood-brain barrier deficiency due to mdr1a P-glycoprotein gene disruption. *Neuropsychopharmacology* 2000;22:380-7.
- Vanni SMDA. Injeção Subaracnóidea Inadvertida de Corticóide em Tratamento de Dor Crônica da Coluna Lombar. Relato de Caso. *Rev Bras Anesthesiol* 2004;54:821-5.

Vianna PV, LA; Yong, LC; Franco, MC; Massone, F. Alterações morfológicas da medula espinhal de cães submetidos à injeção hiperbárica de tetracaína a 1,2%, lidocaína a 5% e glicose a 10%. *Rev Bras Anest* 1985;35:S1-S5.

Watanabe Y, Saito H Abe K. Tricyclic antidepressants block NMDA receptor-mediated synaptic responses and induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 1993;32:479-86.

Weston-Hurst E. Adhesive arachnoiditis and vascular blockage caused by detergents and other chemical irritants: an experimental study. *J Path Bact* 1955;70:167-78.

Woods W Franklin R. Progressive adhesive arachnoiditis following spinal anesthesia. *Calif Med* 1951;75:196-8.

Woolf CJ Decosterd I. Implications of recent advances in the understanding of pain pathophysiology for the assessment of pain in patients. *Pain* 1999;6:S141-7.

Woolf CJ Max MB. Mechanism-based pain diagnosis: issues for analgesic drug development. *Anesthesiology* 2001;95:241-9.

Xia Z, Depierre JW Nassberger L. The tricyclic antidepressants clomipramine and citalopram induce apoptosis in cultured human lymphocytes. *J Pharm Pharmacol* 1996a;48:115-6.

Xia Z, DePierre JW Nassberger L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology* 1996b;34:27-37.

Xia Z, Lundgren B, Bergstrand A, DePierre JW Nassberger L. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Biochem Pharmacol* 1999;57:1199-208.

Yaksh TL Collins JG. Studies in animals should precede human use of spinally administered drugs. *Anesthesiology* 1989;70:4-6.

Yaron I, Shirazi I, Judovich R, Levartovsky D, Caspi D Yaron M. Fluoxetine and amitriptyline inhibit nitric oxide, prostaglandin E2, and hyaluronic acid production in human synovial cells and synovial tissue cultures. *Arthritis Rheum* 1999;42:2561-8.

Zarrindast M, Valizadeh S Sahebgharani M. GABA(B) receptor mechanism and imipramine-induced antinociception in ligated and non-ligated mice. *Eur J Pharmacol* 2000;407:65-72.

Apêndice



Figura 8 - Ângulo de inserção de agulha para realização de punção subaracnóidea em modelo de coluna vertebral de cães.



Figura 9 - Ângulo de inserção de agulha para realização de punção subaracnóidea em modelo de coluna vertebral de cães.

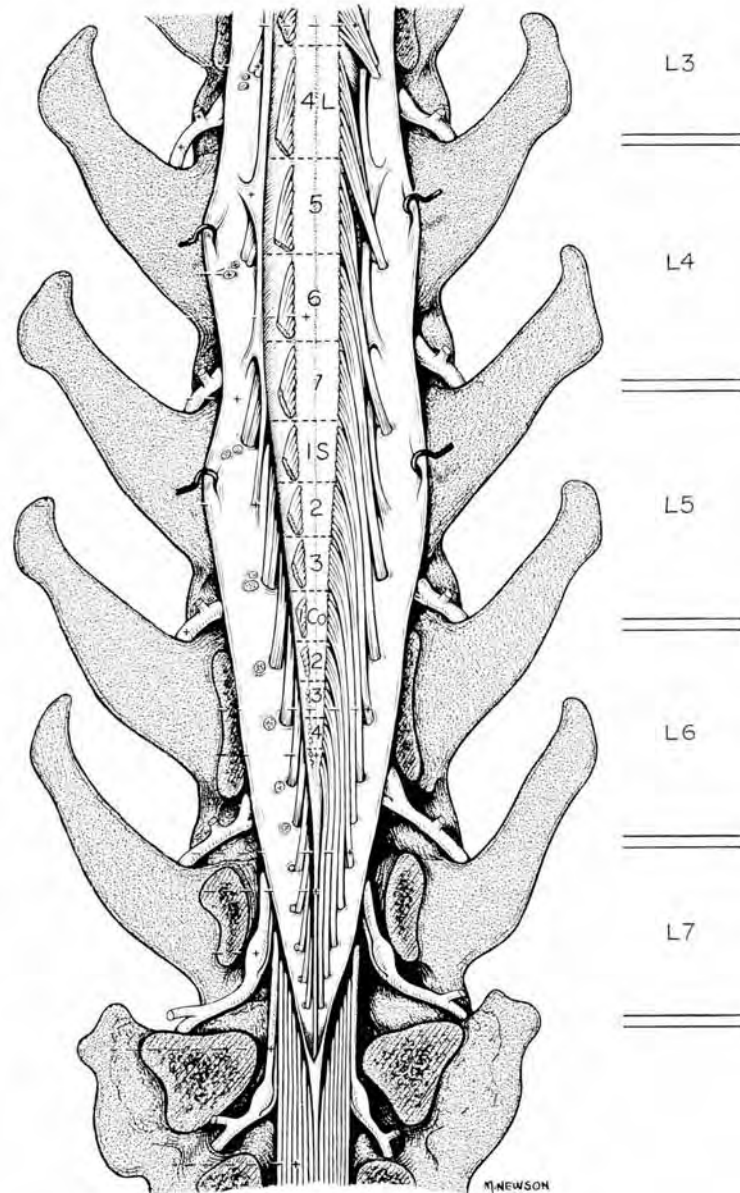


Figura 10 - Região terminal da medula espinhal do cão (Fletcher, 1979).

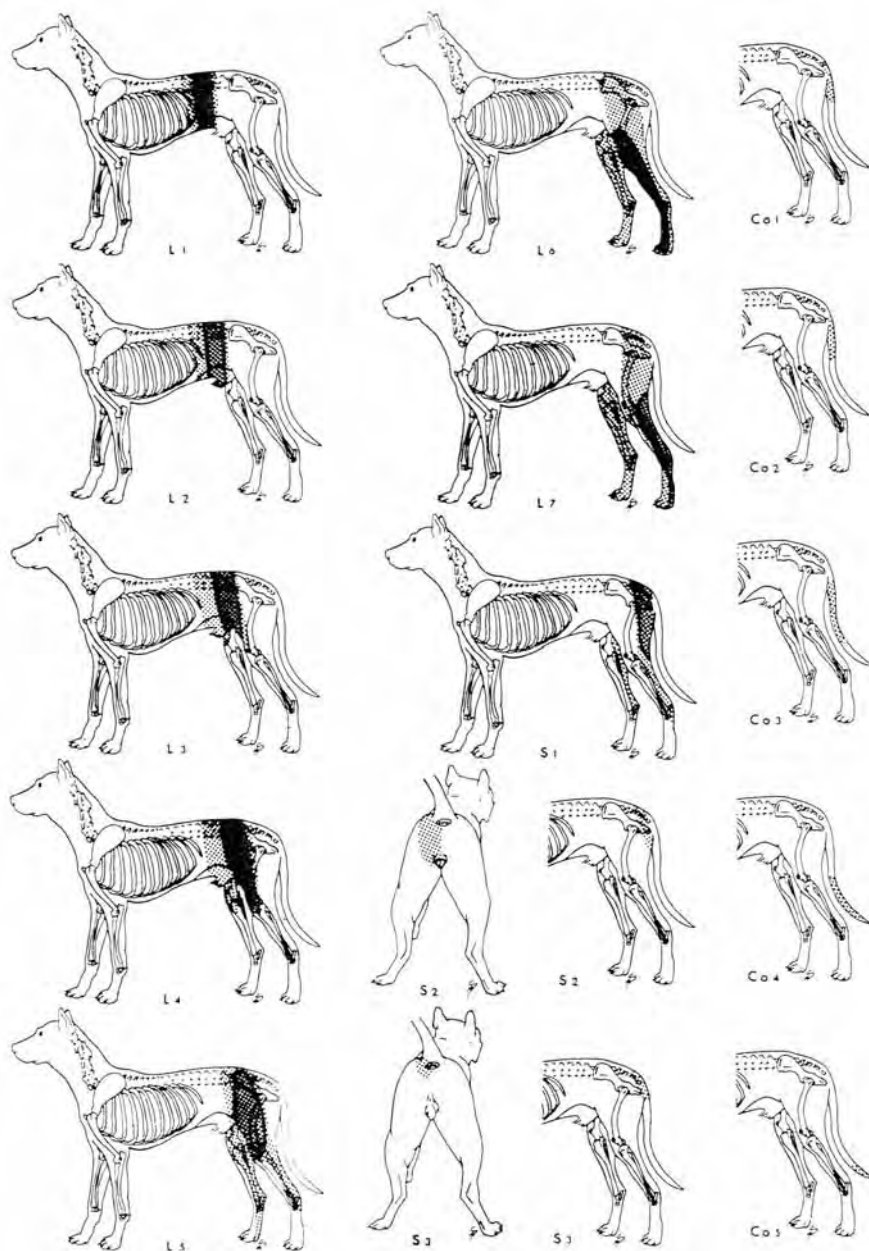


Figura 11 - Dermátomos lombares, sacrais e coccígeos do cão (Fletcher, 1979).