

Marília Freitas de Lemos

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

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

Orientadora: Profª Titular Eliana Marisa Ganem
Coorientadora: Profa. Dra. Lais Helena Navarro e Lima

Botucatu – SP

2014

Epígrafe

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

Dedicatória

Dedico este trabalho

ao ser humano que justificou a minha existência: meu filho, ***Tharik Lemos Mustafá***.

Luz e benção da minha Vida.

Meu imensurável e eterno amor.

Meu grande companheiro.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

Simone de Beauvoir

Dedicatória

À Professora

Eliana Marisa Ganem,

meu sincero agradecimento por ter me proporcionado esta oportunidade ímpar de
aprimoramento.

Minha gratidão será eterna. Muito obrigado!

“A gratidão é a memória do coração”

Antístenes (Filósofo Grego)

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

a Deus que está presente em cada sopro de nossas Vidas;

à Profa. Dra. Laís Helena Navarro e Lima, do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela coorientação da pesquisa;

aos docentes e funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, por terem construído com trabalho árduo e sério, sólidos alicerces de um templo sagrado destinado a excelência do ensino e pesquisa médica em Anestesiologia;

à minha mãe pelo incansável incentivo e doação de seu precioso tempo;

ao meu amado filho por sua compreensão em relação ao tempo que lhe roubei de estar ao seu lado e por suas constantes palavras e gestos de incentivo;

a todos os outros familiares e amigos que me apoiaram e incentivaram;

ao aluno de Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu Felipe Gilberto Valerini, pelo auxílio ímpar na execução desta pesquisa experimental;

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

à Professora Adjunta Mariângela Esther Alencar Marques, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio na avaliação das lâminas histológicas;

ao Professor Dr. Hélio Miot, do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio na avaliação dos marcadores imunohistoquímicos;

à FAPESP, pela concessão de bolsa de Iniciação Científica ao aluno de Graduação, Processo 2011/02291-7 e Auxílio à Pesquisa, Processo 2011/08971-1.

"De tudo ficam três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando

A certeza de que é preciso continuar

E a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminarmos.

Devemos fazer da interrupção um caminho novo,

Da queda uma dança

Do medo uma escada

Do sonho uma ponte

Da procura um encontro"

Fernando Sabino

de Lemos MF. Efeitos do metotrexate subaracnoideo sobre a medula espinal e as meninges de coelhos. Botucatu. 2014. 58p. Tese (Doutorado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu.

RESUMO

Introdução: O câncer é doença caracterizada por desvio dos mecanismos de controle que regulam a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células. A cirurgia, quimioterapia e a radioterapia são os tratamentos utilizados em pacientes oncológicos. Agentes quimioterápicos como o metotrexate (MTX) são considerados antineoplásicos efetivos. Ele pertence à classe dos antimetabólitos que atuam sobre o metabolismo intermediário das células em proliferação. Por ser cada vez mais utilizado nos protocolos de tratamento de câncer, e com doses progressivamente maiores, a ocorrência de toxicidade do tecido nervoso central pelo MTX está aumentada. O mecanismo exato desencadeador de neurotoxicidade não foi elucidado. A manifestação clínica da neurotoxicidade após sua administração pela via subaracnóidea é a aracnoidite química e ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes. Relatos de casos associaram-no também a síndrome da cauda equina. **Objetivo:** Avaliar os efeitos que doses múltiplas de MTX administradas pela via subaracnoidea determinam sobre a medula espinal e as meninges de coelhos. **Método:** Trinta coelhos adultos jovens, machos, da raça Grupo Genético de Botucatu, pesando entre 3000 g e 3900 g, comprimento de coluna vertebral entre 36 e 40 cm e superfície corpórea entre 0,19 e 0,22 m² foram divididos, por sorteio, em três grupos (G): G1, punção subaracnóidea, G2, solução fisiológica e G3, MTX. Após anestesia venosa com xilaziana e cetamina foi realizada a punção subaracnoidea em S1-S2 e injetada a solução sorteada no G2 e G3. Os animais de G3 receberam MTX em volume correspondente a 12 mg.m² de superfície corpórea (0,1mL), os de G2 igual volume de solução fisiológica e nos de G1 foi realizada somente punção subaracnóidea. Este procedimento foi repetido quatro vezes em intervalos de 7 dias. Os animais foram avaliados clinicamente quanto à sensibilidade e motricidade por 21 dias e após sacrificados por decapitação, sob anestesia, e retirada a porção lombar e sacral da medula espinal e meninges para exame histológico [hematoxilina e eosina (HE)] e imunohistoquímica (proteína beta-amilóide).

Resultados: Seis animais morreram durante o período de cativeiro, dois de cada grupo, em decorrência de infecção e fraturas. Os coelhos do G3 emagreceram e se debilitaram durante o período final do cativeiro, o que não ocorreu nos animais do G1 e G2. Nenhum animal apresentou alterações histológicas da medula espinal e das meninges.

Conclusão: Neste modelo experimental em coelhos, a administração subaracnoidea de MTX não desencadeou alterações histológicas sobre o tecido nervoso medular e as meninges.

Palavras-chave: ANESTESIA, Regional: subaracnoidea; QUIMIOTERAPIA: metotrexate; ANIMAIS: coelhos; COMPLICAÇÕES: lesões neurológicas, neurotoxicidade.

de Lemos MF. Effects of spinal metothrexate over spinal cord and meninges of rabbits. Botucatu. 2014. 58p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology), Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Background: Cancer is a disease characterized by deviation of control mechanisms that regulate the survival, proliferation and differentiation of cells. Surgery, chemotherapy and radiotherapy are treatments used in oncology patients. Chemotherapeutic agents such as methotrexate (MTX) are considered effective antineoplastic agents. MTX belongs to the class of antimetabolites that act on the intermediary metabolism of cells on proliferation. For being increasingly used in cancer treatment protocols with progressively larger doses, the occurrence of central nervous tissue toxicity by MTX is increasing. The exact mechanism for triggering neurotoxicity has not been elucidated. The most common clinical manifestation of neurotoxicity after MTX administration is chemical arachnoiditis. Cases of cauda equina syndrome were also described.

Objectives: To evaluate the effects of multiple subarachnoid doses of MTX over spinal cord and meninges of rabbits. **Method:** Thirty male young adults rabbits, breed genetic Group Botucatu, weighing between 3000 and 3900 g, with spinal length between 36 and 40 cm, and corporeal surface area between 0.22 and 0.19 m² were divided by lot into three groups (G): G1, subarachnoid puncture; G2, saline solution; and G3, methotrexate. After intravenous anesthesia with xilaziana and ketamine, subarachnoid puncture was performed in S1-S2. Solution ion was performed inject in G2 and G3. G3 animals received MTX volume corresponding to 12 mg. m² (0.1 mL); in G2, an equal volume of saline solution, was administered G1 only subarachnoid puncture was performed in S1-S2 intervertebral space. Solution injection was performed in G2 and G3. G3 animals received intrathecal MTX volume corresponded to 12mg.m² (0.1 ml); in G2, an equal volume of saline solution was administered, while in G1 only subarachnoid puncture was performed. The same procedure was repeated four times at 7 days interval. Animals were clinically assessed for sensitivity and motricity throughout 21 days after last injection, when they were sacrificed by beheading under anesthesia. Lumbar and sacral portions of spinal cord were withdrawn for histological examination by hematoxylin and eosin (HE) and immunohistochemistry (beta-amyloid protein). **Results:** Six animals

died during the captivity period, two from each group, as a result of infection and fractures. Rabbits from G3 presented with weight loss and weakening during the final period of captivity, which did not occur in animals from G1 and G2. No animal presented histological changes over spinal cord and meninges. **Conclusion:** In this experimental model in rabbits, subarachnoid administration of methotrexate did not trigger histological changes over spinal cord nervous tissue and meninges.

Keywords: ANESTHESIA, Regional: subarachnoid; CHEMOTHERAPY: methotrexate; ANIMALS: rabbits; COMPLICATIONS: neurological damage, neurotoxicity.

Lista de Figuras

Figura 1	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de coelho pertencente a G1. HE 40x.....	35
Figura 2	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de coelho pertencente a G1. HE 100x.....	35
Figura 3	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de coelho pertencente a G2. HE 40x.....	36
Figura 4	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos e meninges (C) normais de coelho pertencente a G2. HE 100x.....	36
Figura 5	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de coelho pertencente a G3. HE 40x.....	37
Figura 6	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de coelho pertencente a G3. HE 100x.....	37
Figura 7	Tecido nervoso normal de coelho de G1. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 40x.....	38
Figura 8	Tecido nervoso normal de coelho de G1. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 100x.....	38
Figura 9	Tecido nervoso normal de coelho de G2. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 40x.	39
Figura 10	Tecido nervoso normal de coelho de G2. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 100x.....	39
Figura 11	Tecido nervoso normal de coelho de G3. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 40x.....	40
Figura 12	Tecido nervoso normal de coelho de G3. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 100x.....	40
Figura 13	Tecido nervoso normal de coelho de G3. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 400x...	41

Lista de Tabelas

Tabela 1	Peso (g), comprimento de coluna vertebral (cm) e superfície corpórea (m ²) dos animais dos três grupos experimentais. Resultados expressos em média e desvio padrão.....	34
-----------------	--	----

Sumário

1 Introdução e Objetivo.....	14
2 Material e Método.....	22
2.1 Animais utilizados.....	22
2.2 Grupos experimentais.....	22
2.3 Sequência experimental.....	23
2.4 Técnicas utilizadas.....	24
2.4.1 Preparo do animal.....	24
2.5 Anestesia subaracnoidea.....	24
2.5.1 Técnica de punção.....	24
2.5.2 Volume injetado e número de doses.....	25
2.5.3 Soluções administradas.....	26
2.5.4 Observação clínica.....	26
2.6 Sacrício.....	27
2.7 Exame histológico.....	27
2.7.1 Técnica imunohistoquímica para proteína precursora beta amilóide.....	27
2.7.2 Hematoxilina e Eosina.....	28
2.8 Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	31
2.9 Modelo de estudo.....	31
2.10 Método estatístico.....	32
2.10.1 Tamanho amostral.....	32
3 Resultados.....	33
4 Discussão.....	42
4.1 Discussão da metodologia.....	42
4.1.1 Ultrassonografia como guia de punção.....	42
4.1.2 Grupos experimentais.....	43
4.2 Discussão dos resultados.....	45
5 Conclusão.....	52
6 Referências.....	53

1 Introdução e Objetivo

No ano 2000, ocorreram cerca de dez milhões de novos casos de câncer e seis milhões de mortes por câncer em todo o mundo. Segundo estimativas da American Cancer Society, o câncer provocou aproximadamente quinhentas mil mortes em 2003, o que correspondeu a mil e quinhentas mortes por dia, equivalentes a 23% de todas as mortes. Não estão incluídos nestes dados os tumores cutâneos não pigmentados e os tumores incipientes não invasivos. No entanto, apesar de a mortalidade por câncer tanto para mulheres como para homens ter diminuído na última década do século XX, o problema ainda continua sendo devastador¹⁻⁴.

A população mundial cresceu e envelheceu implicando no progressivo aumento do total de cânceres, consequentemente se estima 15 milhões de novos casos e 10 milhões de novas mortes para 2020⁴.

Nos Estados Unidos da América, para o ano de 2012 foi projetado ocorrerem 1.638.910 casos novos de câncer e 577.190 mortes pela doença. Entre os anos de 2004 e 2008, a incidência de câncer diminuiu significativamente nos homens (0,6% por ano) e permaneceu estável nas mulheres, enquanto que a taxa de mortalidade diminuiu em 1,8% por ano nos homens e em 1,6% nas mulheres. A taxa de mortalidade continua declinando para os quatro mais frequentes tipos de câncer que são o de pulmão, o colorretal, o de mama e o de próstata, sendo o câncer de pulmão responsável por quase

40% do total de redução da mortalidade nos homens e o câncer de mama por 34% do total de declínio nas mulheres⁵.

No Brasil, segundo os dados publicados pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), em 2012 o número total de casos novos de câncer em homens foi de 257.870 e em mulheres de 260.640. Foram estimados 94.230 novos casos dos cinco tipos de câncer mais comuns nos homens, que correspondem a 58,5% do total de todos os cânceres em homens e 106.880 mil novos casos dos cinco tipos de cânceres mais comuns em mulheres, que correspondem a 57,5% do total de todos os cânceres nas mulheres. O número total de casos novos de linfoma não Hodgkin e de leucemias foi de 9.640 e 8.510 respectivamente. Dentre os tumores pediátricos a leucemia é o tipo mais frequente, correspondendo entre 25% e 35% dos cânceres, sendo a leucemia linfóide aguda (LLA) a de maior ocorrência em crianças com idade entre 0 e 14 anos⁶.

O câncer é a doença caracterizada por desvio dos mecanismos de controle que regulam a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células. As células que sofreram transformação neoplásica expressam, habitualmente, antígenos de superfície celular que podem ser do tipo fetal normal com sinais de imaturidade aparente ou apresentar anomalias cromossômicas qualitativas ou quantitativas, como diversas translocações e aparecimento de sequências gênicas amplificadas. Essas células proliferam excessivamente e formam tumores locais que podem comprimir ou invadir as estruturas normais adjacentes^{7, 8}.

Existe uma pequena subpopulação de células no interior do tumor, descritas como células-tronco tumorais, que apresentam capacidade de replicação excessiva e de migração para locais distantes de sua origem, colonizando diversos órgãos por processo

denominado metástase. Por conseguinte, essas células-tronco tumorais podem exibir capacidade clonogênica ou formadora de colônias^{7,8}.

As células-tronco tumorais caracterizam-se por anormalidades cromossômicas que refletem a sua instabilidade genética, resultando em seleção progressiva de subclones que podem sobreviver com mais facilidade no ambiente multicelular do hospedeiro. Tal progressão neoplásica é acompanhada de anormalidades quantitativas em diversas vias metabólicas e em componentes celulares. Os processos invasivos e metastáticos, bem como uma série de anormalidades metabólicas decorrentes do câncer causam a doença e, por conseguinte, levam à morte, a menos que a neoplasia possa ser erradicada com tratamento^{9,10}.

A cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são os tratamentos usualmente utilizados em pacientes oncológicos. A cirurgia, associada ou não à radioterapia, pode ser efetiva na cura do tumor que ainda não sofreu metástase. É descrita frequência de cura em 33% desta população, desde que o tumor seja descoberto e tratado precocemente. A ocorrência precoce de micrometástases indica necessidade de abordagem mais agressiva, instituindo o tratamento quimioterápico, para o controle efetivo do câncer¹¹⁻¹³.

Quando utilizada para o tratamento do câncer, a quimioterapia pode ser curativa até mesmo para certas neoplasias disseminadas, tanto macroscópicas como microscopicamente¹¹⁻¹³.

Em pacientes nos quais a doença se encontra disseminada, a quimioterapia constitui terapêutica mais paliativa do que curativa, com a finalidade de melhorar temporariamente os sinais e sintomas do câncer e, conseqüentemente, a qualidade de vida do paciente¹¹⁻¹³.

Mesmo quando a metástase já está presente, aproximadamente 50% a 60% dos pacientes respondem à quimioterapia. Os agentes quimioterápicos como o metotrexate, a cisplatina, a ciclofosfamida, a gencitabina, a capecitabina, a navelbina, taxanos (docetaxel, paclitaxel e baclitaxel, ligados à albumina) e as antraciclinas (doxorubicina, mitoxantrona e epirrubicina) podem ser considerados antineoplásicos efetivos¹¹⁻¹³.

O metotrexate pertence à classe dos antimetabólitos, que atuam sobre o metabolismo intermediário das células em proliferação. Embora, até o presente momento, não se tenha descoberto nenhuma propriedade peculiar compartilhada por todas as células cancerosas, estas possuem diversas particularidades metabólicas quantitativas que diferem daquelas observadas nas células normais, o que as tornam mais sensíveis aos agentes antimetabólicos ou análogos estruturais^{14, 15}.

Muitos desses fármacos foram sintetizados com base no conhecimento dos processos celulares fundamentais envolvidos na biossíntese do ácido desoxirribonucléico (DNA)^{14,15}.

O metotrexate, quimioterápico introduzido na prática clínica há mais de 50 anos, apresenta ação farmacológica pelo antagonismo ao ácido fólico, ligando-se ao sítio catalítico ativo da enzima diidrofolato redutase (DHFR), interferindo na síntese da forma reduzida, a qual aceita unidades de carbono. A ausência deste cofator interrompe a síntese *de novo* do timidilato, de nucleotídeos da purina dos aminoácidos serina e metionina, interferindo na formação do DNA, do ácido ribonucléico (RNA) e de proteínas-chave celulares¹⁴⁻¹⁷.

Este fármaco é amplamente empregado no tratamento de leucemia linfoblástica aguda (LAA), da doença de Hodgkin e do linfoma não Hodgkin, do meduloblastoma, do osteossarcoma, do câncer mediastinal, de linfomas do SNC, de metástases

leptomeníngeas e também em doenças autoimunes como a psoríase e a artrite reumatóide¹⁴⁻¹⁷.

O metotrexate pode ser administrado pelas vias intravenosa, subaracnoidea e oral. Aproximadamente 90% da dose administrada por via oral são excretados na urina em 12 horas e como o fármaco não é metabolizado, os níveis séricos observados são proporcionais à dose desde que a função renal e a hidratação estejam adequadas^{14, 15}.

Por ser cada vez mais utilizado nos protocolos de tratamento de câncer e com doses progressivamente maiores, a possibilidade de ocorrer toxicidade no tecido nervoso central está aumentada, toxicidade esta que na maioria das vezes é transitória e reversível, podendo eventualmente cursar com lesões mais graves, levando ao coma e à morte¹⁶.

A neurotoxicidade desencadeada pelos antineoplásicos pode ser resultado de efeitos diretos sobre o SNC ou indiretos, por indução de alterações metabólicas e vasculares. O metotrexate introduzido no espaço subaracnoideo para o tratamento de linfoma e de leucemia do SNC foi associado à ocorrência de neurotoxicidade¹⁷.

Apesar de pesquisas terem sido realizadas, o mecanismo exato pelo qual o metotrexate desencadeia neurotoxicidade ainda não foi elucidado. Estas postulam que a neurotoxicidade advém de lesão direta ao SNC e que as alterações metabólicas induzidas pelo fármaco poderiam ser, embora de forma menos importante, mecanismos que contribuiriam para o aparecimento das lesões¹⁶.

A manifestação clínica da neurotoxicidade desencadeada pelo metotrexate apresenta grande variedade de sintomas e pode ser classificada em aguda, subaguda ou crônica. A associação de quimioterápicos, a via de administração e a dose administrada são importantes no desenvolvimento da toxicidade^{16,17}.

Após a administração subaracnoidea de metotrexate, a aracnoidite química é a manifestação de toxicidade mais frequente, que ocorre em aproximadamente 50% dos pacientes, sendo na maioria das vezes autolimitada. Outra complicação, a mielopatia transitória inflamatória, acomete menos de 3% dos indivíduos e juntamente com a aracnoidite química constituem as manifestações clínicas de neurotoxicidade mais comuns¹⁷.

É descrito que quando o metotrexate é introduzido no espaço subaracnóideo há contato intenso entre o fármaco e as raízes ventrais na região lombossacral, que são as mais intensamente banhadas pelo líquido, e que este pode ser um dos mecanismos de lesão envolvido no aparecimento da polirradiculopatia. Esta complicação é rara, acometendo principalmente crianças, desencadeando um quadro clínico caracterizado por paralisia flácida progressiva e disfunção dos esfíncteres anal e vesical¹⁷.

Alguns autores associaram a síndrome da cauda equina à utilização do metotrexate pela via subaracnoidea. Esta se origina de alterações na função das raízes que a constituem, ou seja, de L2 a S5. Caracteriza-se por disfunção vesical e intestinal, graus variáveis de fraqueza muscular nos membros inferiores e perda da sensibilidade em áreas do períneo (anestesia em sela). Lesões de S3-S4 causam atonia vesical. Seu diagnóstico é realizado pela história clínica e pela eletroneuromiografia. O quadro clínico é irreversível¹⁷⁻²⁰.

Quando administrado no espaço subaracnoideo, de forma similar ao observado pela via oral, o metotrexate desencadeia efeitos tóxicos diretos sobre o tecido nervoso, que se manifesta na forma de leucoencefalopatia necrosante focal ou disseminada, degeneração difusa parenquimatosa com gliose, distrofia axonal, microangiopatia

mineralizada, calcificação distrófica, necrose coagulativa da pia-máter, intumescência axonal, desmielinização e astrocitose^{16, 21}.

Tendo em vista a ampla variação de alterações histológicas, alguns experimentos foram realizados *in vivo* e *in vitro* com o intuito de elucidar o mecanismo desencadeador da neurotoxicidade, com resultados não conclusivos^{16, 21}.

De acordo com o proposto por Bruce-Gregorios et al.²², acredita-se que a astrocitose observada em seu estudo seja a causa da axonopatia observada após o uso de metotrexate, e que esta seja predominantemente decorrente da inibição do RNA e da síntese *de novo* de purinas pelo fármaco.

Outros autores especulam como possível causa desencadeadora de toxicidade do tecido nervoso a presença de preservativos nas preparações comerciais de metotrexate, assim como o emprego de diluentes que não possuem pH, conteúdo iônico ou osmolaridade adequados para ser administrado no neuroeixo¹⁷.

Embora os estudos experimentais em animais e os casos clínicos publicados na literatura tenham sugerido a associação entre a administração subaracnoidea do metotrexate com neurotoxicidade, o diagnóstico das alterações histológicas do tecido nervoso pelas técnicas rotineiramente empregadas é difícil.

Está descrito na literatura caso grave de neurotoxicidade atribuída ao metotrexate no qual exame histológico pelo método de hematoxilina e eosina (HE) nada revelou, porém a análise histológica pelo método de imunohistoquímica para a proteína precursora beta-amilóide foi capaz de detectar a lesão axonal²¹.

Está bem documentado o emprego da imunohistoquímica para análise da proteína precursora beta-amilóide na detecção da lesão axonal desencadeada por trauma

direto e ainda por infarto cerebral, esclerose múltipla e encefalite por vírus da Síndrome da Imunodeficiência Humana (AIDS)²¹.

Moore et al. obtiveram resultados satisfatórios na detecção da lesão celular desencadeada pela administração subaracnoidea de metotrexate utilizando a proteína precursora beta-amilóide²¹.

A maneira pela qual os agentes neurotóxicos modificam as células do sistema nervoso são de interesse considerável porque o funcionamento do SNC como um todo depende das interações de diversas de suas partes. No SNC, se há interferência com alguns elementos estruturais, a alteração é reversível, porém se houver lesões de neurônios, estas podem ser irreversíveis. Embora haja adaptação plástica por outros neurônios, a ausência de regeneração central impede o retorno da função celular após a morte da célula. E a morte celular não é necessariamente obrigatória para que existam alterações funcionais, uma vez que, as reações tóxicas em qualquer população de células ou receptores podem influenciar a função neurológica algumas vezes de forma irreversível²³.

Portanto, como os resultados de estudos publicados na literatura são controversos no que diz respeito aos efeitos que os quimioterápicos determinam sobre os tecidos contidos no neuroeixo, esta pesquisa tem por objetivo avaliar os efeitos que doses múltiplas de metotrexate administradas pela via subaracnoidea determinam sobre a medula espinal e as meninges de coelhos.

2 Material e Método

2.1 Animais utilizados

Foram utilizados 30 coelhos adultos jovens, machos, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 3000 e 3900 gramas, comprimento de coluna entre 36 e 40 centímetros e superfície corpórea entre 0,19 e 0,22 m², 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 em que houve dificuldade na abordagem do espaço subaracnoideo.

2.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos por lista gerada por computador e envelopes selados em três grupos experimentais, com 10 animais em cada grupo, submetidos, inicialmente, à anestesia intravenosa com xilazina e cetamina e, em seguida, à punção subaracnoidea. Cada animal foi submetido ao mesmo tratamento quatro vezes, em intervalos de sete dias. Os grupos diferenciaram-se pela presença ou não de fármaco.

Grupo 1 (G1) – Controle de punção – Punção subaracnoidea

Grupo 2 (G2) – Controle de volume – Solução fisiológica 0,9%

Grupo 3 (G3) – Metotrexate

2.3 Sequência experimental

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

- Jejum alimentar de 12 horas com livre acesso à água
- Pesagem
- Anestesia com xilazina e cetamina
- Posicionamento do animal em decúbito ventral na mesa
- Medida da altura do animal
- Limpeza local com água e sabão
- Tricotomia
- Limpeza do local com solução salina fisiológica estéril
- Antissepsia com gluconato de clorexidina a 2%.
- Colocação de campo estéril
- Palpação e identificação dos espaços intervertebrais
- Punção subaracnoidea sob orientação do ultrassom
- Punção ou injeção da solução sorteada
- Retirada do animal da mesa
- Observação clínica até recuperação da anestesia venosa
- Manutenção em cativeiro durante 21 dias sob observação clínica
- Sacrifício do animal
- Remoção da medula espinal em sua porção lombar e sacral
- Fixação da peça anatômica
- Análise histológica

2.4 Técnicas utilizadas

2.4.1 Preparo do animal

- Após período de jejum de 12 horas com livre acesso à água, os animais foram pesados e anestesiados com injeção intravenosa de cloridrato de xilazina, na dose de 3 mg.kg^{-1} de peso corporal, e cloridrato de cetamina, na dose de 10 mg.kg^{-1} de peso corporal.
- Após a anestesia venosa, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica e obtenção da altura, calculada pela distância entre a ponta do focinho e o início da cauda, medida pela face dorsal do animal.
- 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 seria realizada a punção, correspondente ao espaço intervertebral S1 – S2. Esta região foi lavada com solução fisiológica a 0,9% e, após a antissepsia com solução tópica de gluconato de clorexidina a 2%, foram colocados os campos estéreis.

2.5 Anestesia subaracnoidea

2.5.1 Técnica de punção

No coelho, o espaço mais caudal que permite a abordagem do espaço subaracnoideo encontra-se entre as vértebras S1 e S2. Para a identificação deste espaço e a determinação do local da punção subaracnoidea, palpam-se as cristas ilíacas e identifica-se 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 da ultrassonografia, utilizando o aparelho da marca SonoSite (USA), modelo M-turbo, que possui o recurso de Doppler tecidual de parede (TDI). Foi utilizado o transdutor micro-linear com frequência de 6 a 13 MHz

A punção subaracnoidea foi realizada com agulha de Quincke de calibre 22G 1½, por acesso mediano e com ângulo de inclinação de aproximadamente 45°. A agulha foi introduzida lentamente em direção cefálica, guiada pelo ultrassom, até penetrar no espaço subaracnoideo.

Após a localização do espaço subaracnoideo, os animais do G1 não receberam nenhuma solução e os do G2 e G3 a solução fisiológica 0,9% e o metotrexate, respectivamente.

2.5.2 Volume injetado e número de doses

Nos animais pertencentes aos grupos 2 e 3 foram administrados, respectivamente, solução fisiológica 0,9% e metotrexate em volumes correspondente a dose de 12 mg.m⁻² (aproximadamente 0,1 mL), injetados em um segundo em seringa de um mL. O procedimento foi repetido por quatro vezes em intervalos de sete dias.

Para calcular a dose administrada foi utilizada a fórmula da superfície corpórea (SC), ou seja:

$$SC = 0,007184 \times [\text{altura (cm)}^{0,725}] \times \text{peso (kg)}^{0,425}$$

2.5.3 Soluções administradas

A solução fisiológica 0,9% (Grupo 1) foi sintetizada pela indústria farmacêutica Cristália.

O metotrexate foi sintetizado pela indústria Rodhia Farma Ltda, acondicionado em frasco-ampola de 2 mL contendo 50 mg.

2.5.4 Observação clínica

Após a punção subaracnoidea ou a injeção da solução sorteada, os animais foram retirados da mesa cirúrgica e, quando recuperados da anestesia venosa, foram avaliados clinicamente quanto à motricidade e à sensibilidade dolorosa. A motricidade foi avaliada pela observação clínica baseada no critério estabelecido por Drummond & Moore²⁴, ou seja: 3-movimento livre das extremidades inferiores; 2-assimetria e limitação para sustentar o corpo e para deambular por alteração nas extremidades inferiores; 1-inabilidade para sustentar o corpo pelas extremidades inferiores; 0-paralisia das extremidades inferiores. Na sequência foi avaliada a sensibilidade dolorosa por meio de preensão nas extremidades inferiores e superiores, bem como da pele da região dos dermatomos sacrais, lombares, torácicos e da orelha com auxílio da pinça dente de rato.

Os animais permaneceram em cativeiro durante 21 dias após a última punção ou administração da solução, sob observação. Foram verificadas as alterações motoras utilizando-se do critério de Drummond & Moore²⁴. A sensibilidade dolorosa foi avaliada pela observação dos seguintes sinais indicativos de dor: retração da pata, mudança de postura e gemência após a aplicação dos estímulos dolorosos descritos acima.

2.6 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 eqüina foram retiradas em tempo inferior a 3 minutos, para minimizar os riscos de lesão tecidual desencadeada por isquemia e apoptose. O tecido medular e as meninges foram fixados em solução de formalina a 10% para posterior exame histológico.

2.7 Exame histológico

Os cortes transversais do tecido nervoso e das meninges iniciaram-se, aproximadamente, dez centímetros acima do local onde foi realizada a punção subaracnoidea, estendendo-se até o final da cauda eqüina em intervalos de meio centímetro. Os cortes de tecido medular foram colocados em blocos de parafina e corados pelo método de HE e para imunohistoquímica da proteína beta-amiloide.

2.7.1 Técnica imunohistoquímica para proteína precursora beta amiloide

Para a realização da técnica de imunohistoquímica para a proteína precursora beta amiloide, 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 cinco minutos em cada cuba, então por quatro cubas de etanol absoluto, também por cinco minutos em cada uma delas, e 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. Após as lâminas serem lavadas em água destilada, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor em panela pressurizada Pascal (Dako) por três minutos em temperatura de 117°C em solução de citrato de sódio 0,21%, pH 6,0.

Seguindo-se a lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas foram transferidas para bandejas especiais para imunohistoquímica, 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 beta-amiloide, permanecendo assim incubado por 18 h em geladeira a 4°C. Os anticorpos primários foram retirados por meio de lavagem em PBS e incubados com os anticorpos secundário e terciário (ligação e amplificação HRP) durante 30 minutos, cada uma das incubações, em temperatura ambiente.

Os cortes novamente lavados em PBS foram revelados pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina por 5 minutos e, após a revelação, foram lavados em água corrente e contra corados em hematoxilina segundo Harris (MERCK) por um minuto. Os cortes então passaram pelo processo de desidratação em quatro cubas com etanol absoluto e diafanização em três cubas com xilol e, por fim, as lâminas foram montadas com lamínulas 24x32 (KNITTEL) por meio de resina sintética Permount (FISHER – SP 15-500) e lidas em microscópio óptico.

2.7.2 Hematoxilina e Eosina

O exame histológico das lâminas foi efetuado pela microscopia óptica. Os resultados obtidos pela análise dos cortes do tecido nervoso e das meninges foram

classificados como normais quando não apresentaram alterações ou lesados, determinando-se os achados observados de acordo com os seguintes critérios:

- **tipo de lesão**
 - 1 - aracnoidite
 - 2 - aracnoidite + lesão nervosa
 - 3 - lesão nervosa
- **localização da lesão**
 - 1 - região posterior (P)
 - 2 - região lateral (L)
 - 3 - região anterior (A)
 - 4 - P+ L
 - 5 - L+A
 - 6 - P+L+A
- **extensão da lesão**
 - 1- <10%
 - 2- 10-50%
 - 3- >50%;
- **profundidade da lesão**
 - 1 - substância branca
 - 2 - substância cinzenta
 - 3 - substâncias branca e cinzenta
- **vaso sanguíneo**
 - 1 - normal
 - 2 - espessamento fibroso
 - 3 – trombose

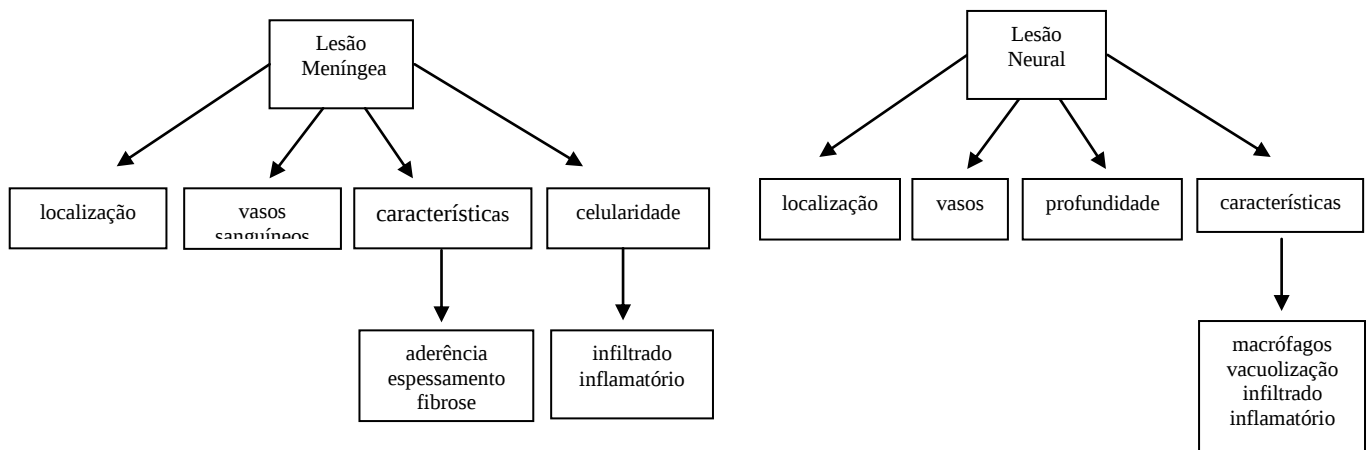
Na presença de aracnoidite adesiva:

- **aderência**
 - 0 - ausente
 - 1 - dura-máter (D) + aracnóide (A)
 - 2 - A+ pia-máter (P)
 - 3 - D + A+ P
- **espessamento de meninge**
 - 0 - ausente
 - 1 - leve
 - 2 - moderado
 - 3 - intenso
- **infiltrado linfoplasmocitário**
 - 0 - ausente
 - 1 - leve
 - 2 - moderado
 - 3 - intenso
- **fibrose**
 - 0 - ausente
 - 1 - leve
 - 2 - moderada
 - 3 - intensa

Na presença de lesão de nervo:

- 1 - vacuolização
- 2 - infiltrado linfoplasmocitário
- 3 – macrófagos

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



Organograma da avaliação histológica

2.8 Comissão de Ética em Experimentação em Animal

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, Protocolo CEEA 870-2011.

2.9 Modelo de estudo

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

Os grupos foram randomizados a partir de lista gerada por computador e por envelopes selados. A preparação do metotrexate foi realizada por pesquisador não

envolvido diretamente na realização da pesquisa, com todos os procedimentos de segurança necessários em local que continha fluxo laminar.

2.10 Método estatístico

2.10.1 Tamanho Amostral

Pressupondo-se uma estimativa de taxa de lesão do tecido nervoso de 70%²⁵ e de taxa induzida de 1% para a solução fisiológica, para um valor α de significância de 5% (limite para detecção de erro tipo I) e um poder de 95%, foram necessários oito animais por grupo. Tendo como objetivo avaliar a homogeneidade dos grupos com relação ao peso, ao comprimento de coluna vertebral e a área de superfície corpórea foi realizado, como método estatístico, o teste de Anova, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

3 Resultados

Seis animais morreram durante o período de cativeiro, dois de cada grupo, em decorrência de infecção ou fraturas. Os coelhos do grupo do metotrexate emagreceram e se debilitaram e tiveram infecção de pele durante o período final do cativeiro, o que não ocorreu nos grupos punção (G1) e solução fisiológica (G2), os quais não foram submetidos ao tratamento com o quimioterápico. Os coelhos de G1 e G2 tiveram fraturas nas patas posteriores.

Nenhum animal foi excluído do experimento por dificuldade na realização da punção subaracnoidea. Todos foram submetidos a quatro punções.

Os 24 coelhos que foram avaliados permaneceram clinicamente normais sob o ponto de vista neurológico durante o período de cativeiro (21 dias após a quarta punção subaracnoidea).

A análise estatística dos três grupos experimentais mostrou que houve homogeneidade entre os grupos com relação ao peso ($p=0,97$; $F=0,03$), ao comprimento de coluna vertebral ($p=0,17$; $F=1,91$) e a superfície corpórea ($p=0,24$; $F=1,54$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Peso (g), comprimento de coluna vertebral (cm) e superfície corpórea (m²) dos animais dos três grupos experimentais. Resultados expressos em média e desvio padrão.

	G1	G2	G3
Peso (g)	3371 ± 290	3366 ± 219	3340 ± 300
Comprimento de coluna vertebral (cm)	38,5 ± 0,9	38,0 ± 1,1	39,0 ± 1,1
Superfície corpórea (m ²)	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01

A avaliação histológica do tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges dos 24 animais pertencentes aos três grupos experimentais mostraram-se normais, tanto quando se utilizou a coloração pelo método HE (Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6), quanto pela técnica imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide (Figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13).

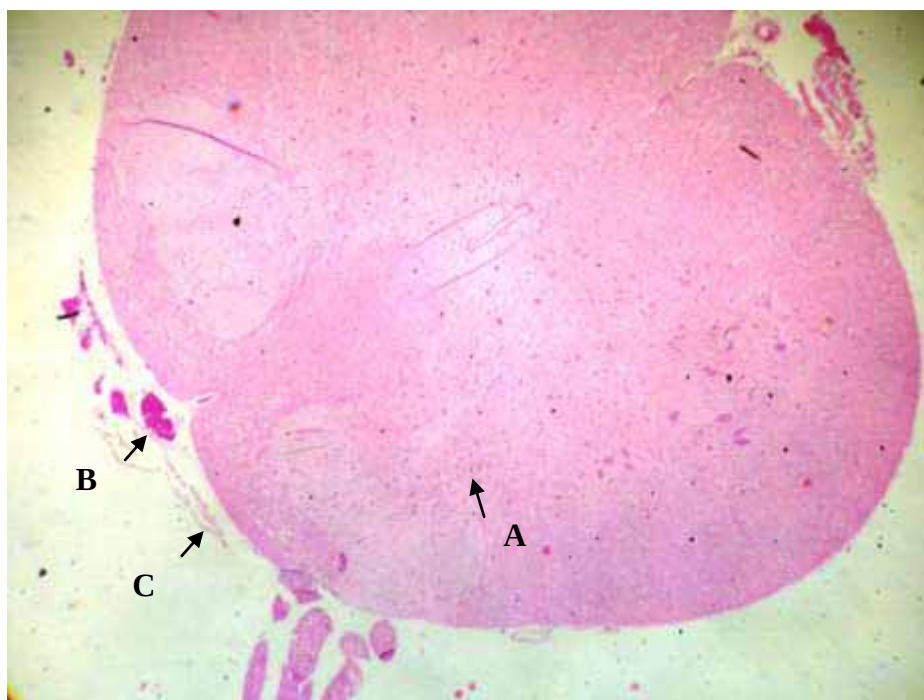


Figura 1 - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de coelho pertencente a G1. HE 40x.

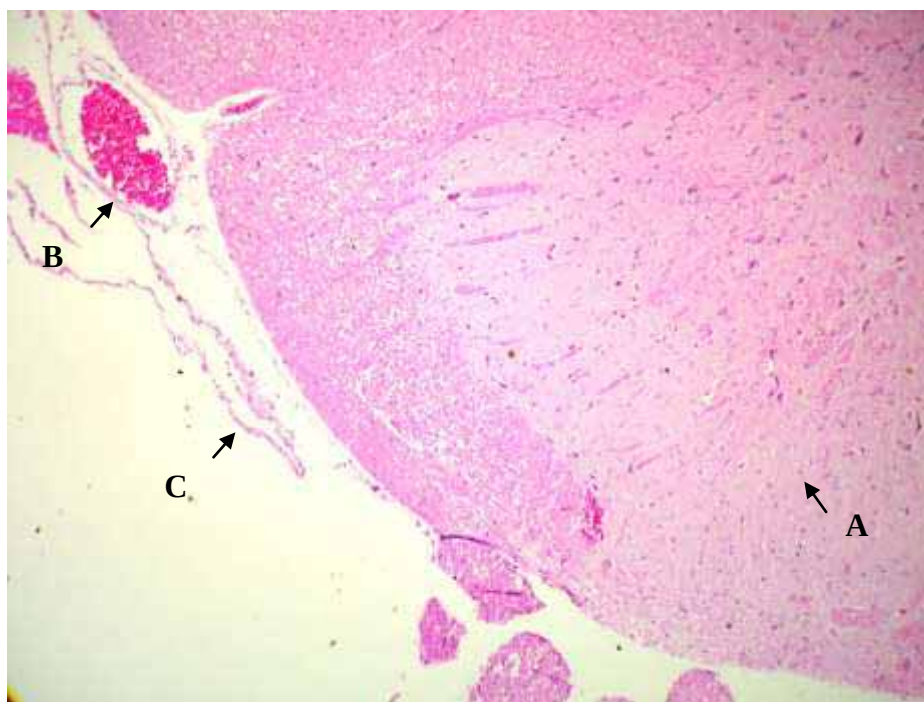


Figura 2 - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de coelho pertencente a G1. HE 100x.

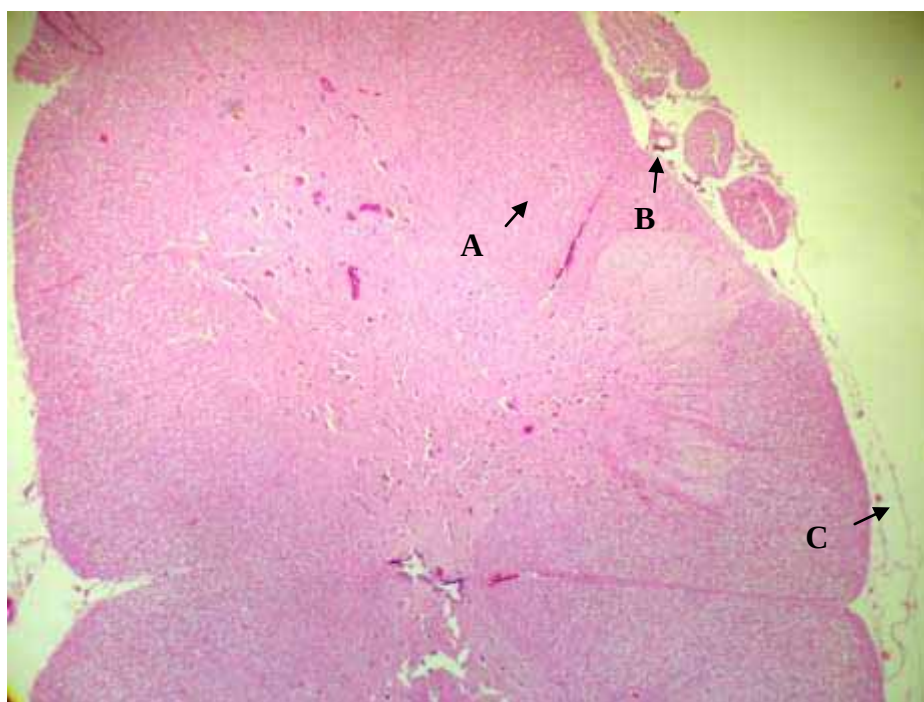


Figura 3 - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de coelho pertencente a G2. HE 40x.

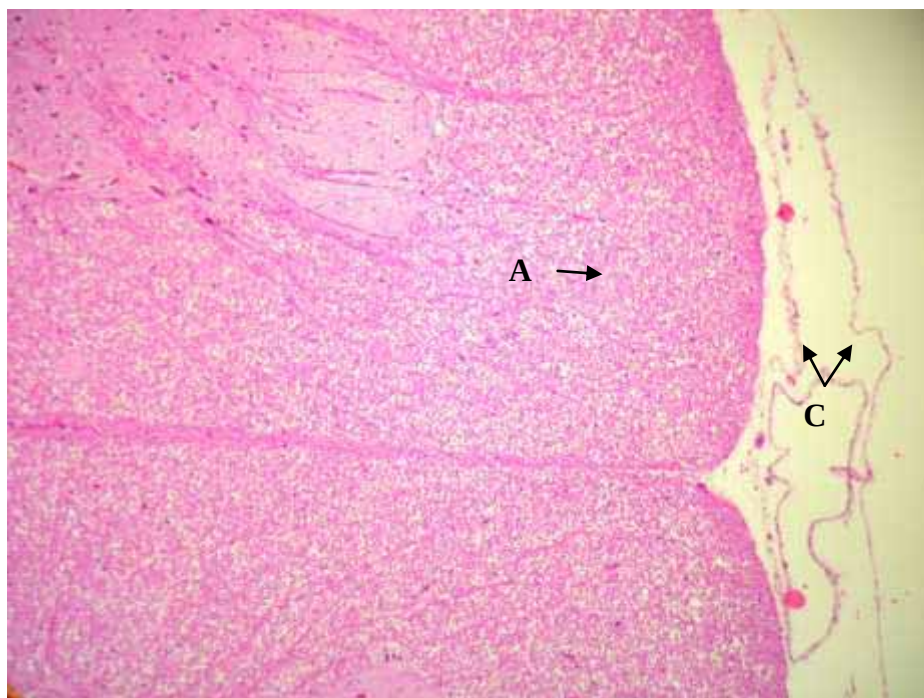


Figura 4 - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos e meninges (C) normais de coelho pertencente a G2. HE 100x.

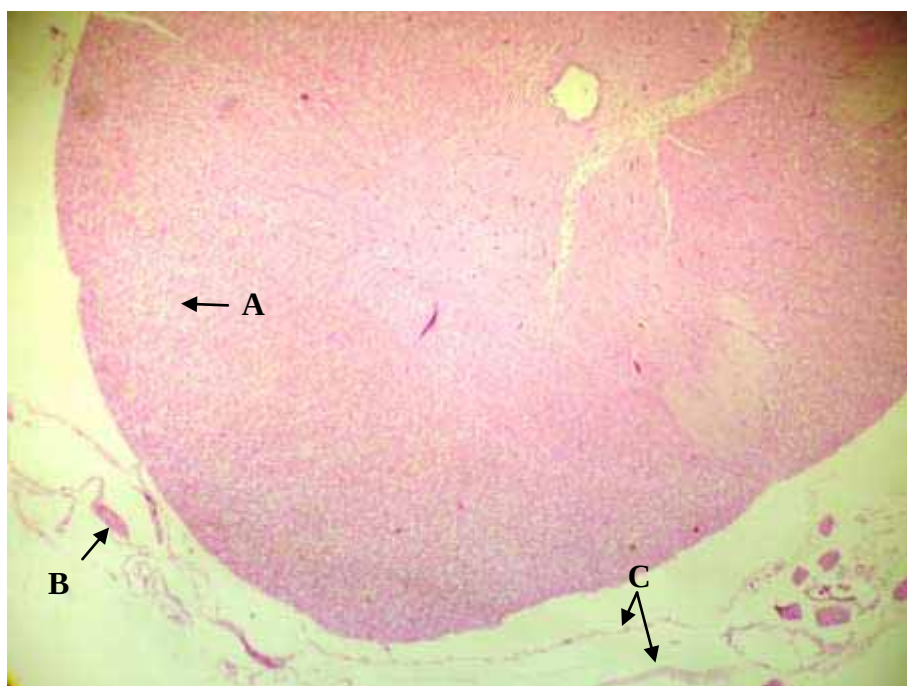


Figura 5 - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de coelho pertencente a G3. HE 40x.

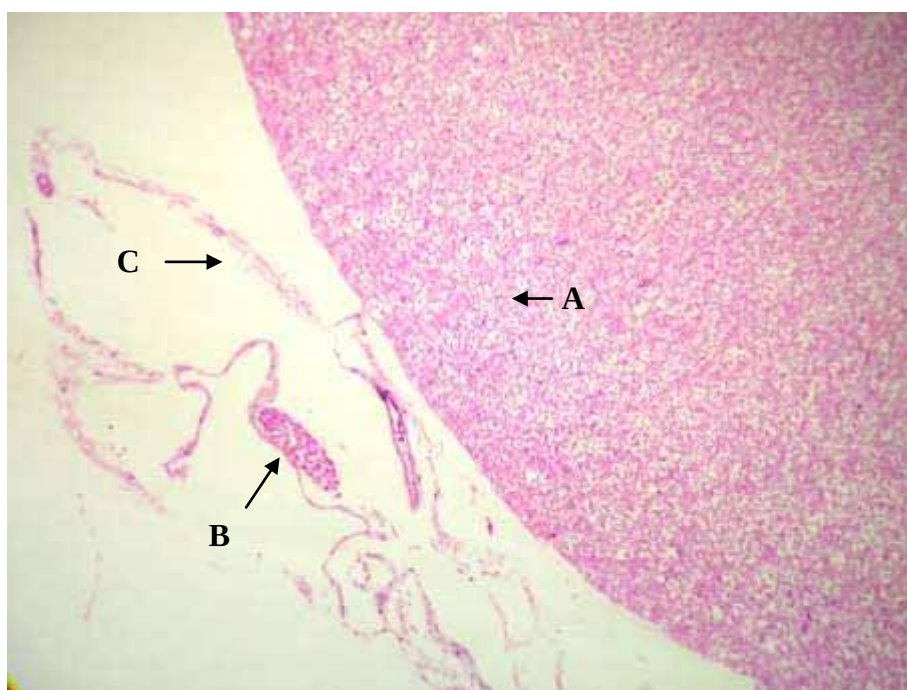


Figura 6 - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais de coelho pertencente a G3. HE 100x.

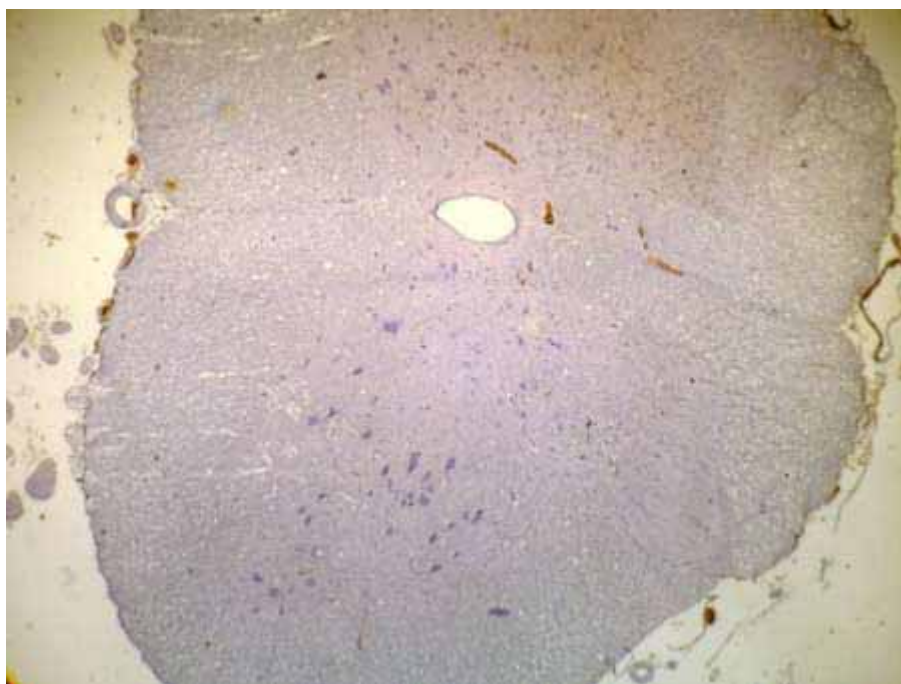


Figura 7 - Tecido nervoso normal de coelho de G1. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 40x.

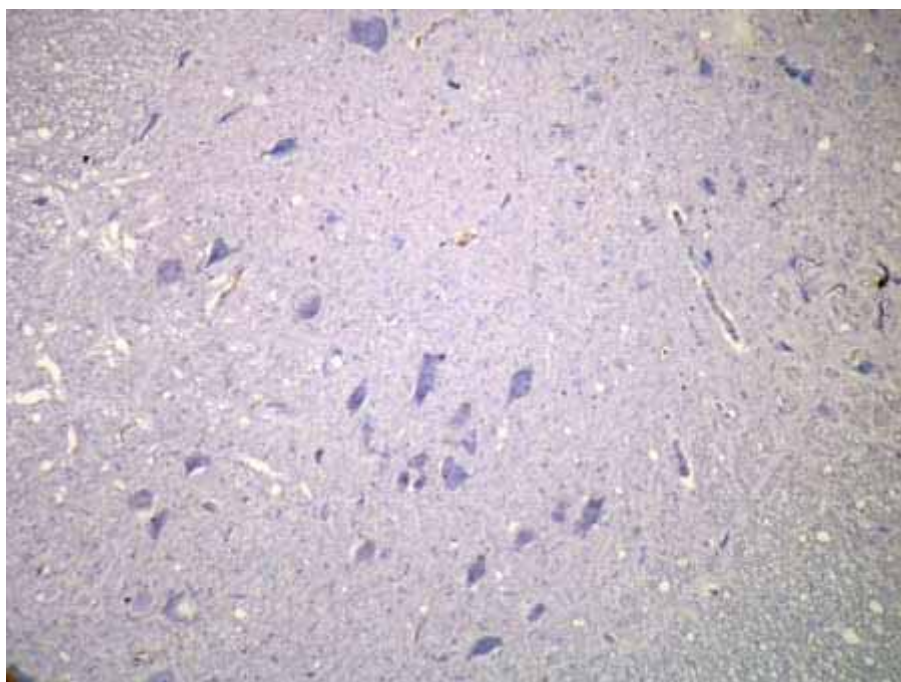


Figura 8 - Tecido nervoso normal de coelho de G1. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 100x.

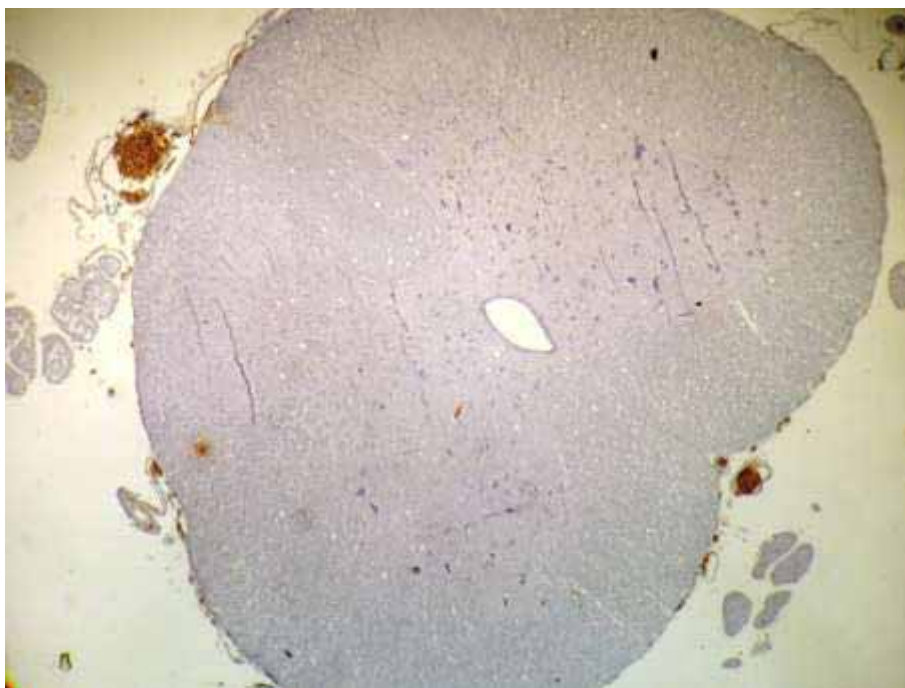


Figura 9 - Tecido nervoso normal de coelho de G2. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 40x.

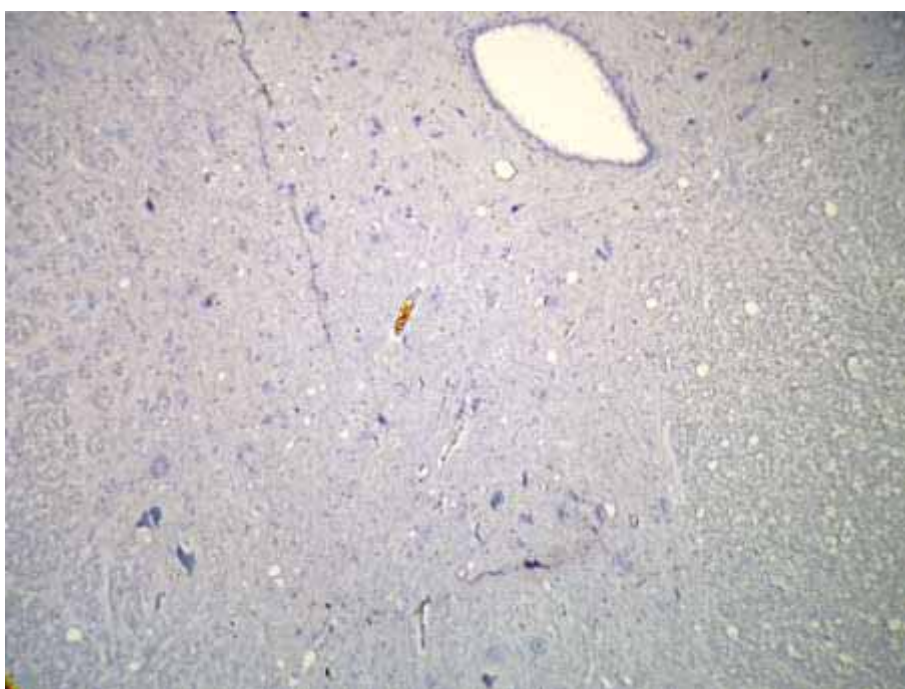


Figura 10 - Tecido nervoso normal de coelho de G2. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 100x.

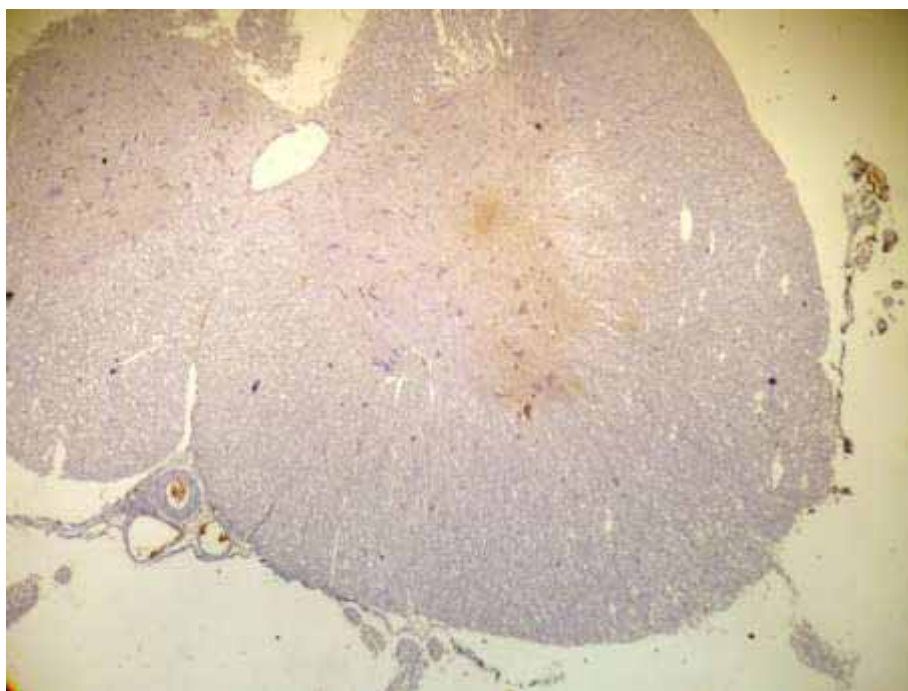


Figura 11 - Tecido nervoso normal de coelho de G3. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 40x.

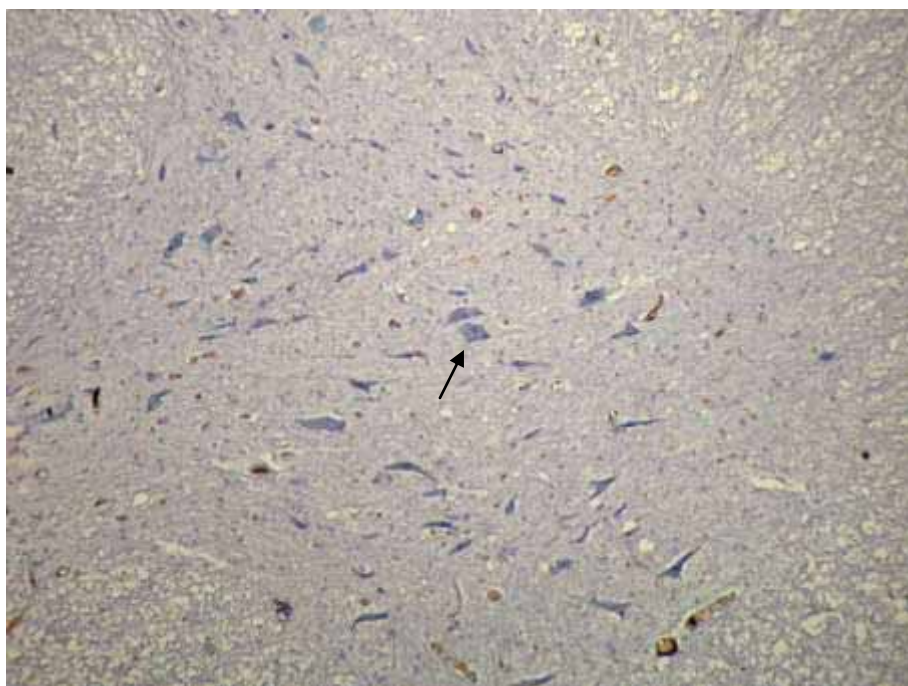


Figura 12 – Tecido nervoso normal de coelho de G3. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 100x.

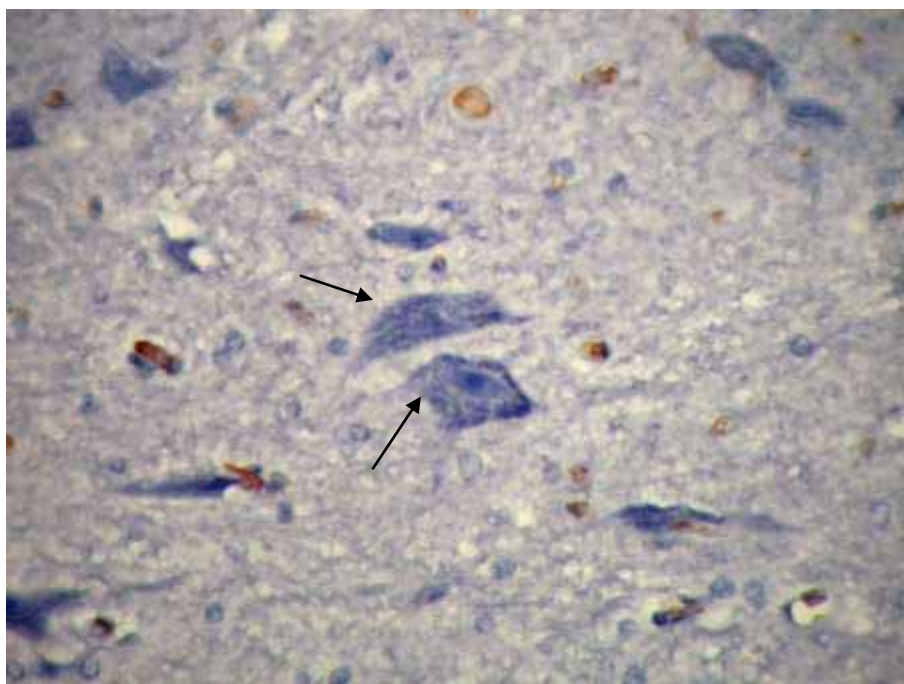


Figura 13- Tecido nervoso normal de coelho de G3. Técnica de imunohistoquímica para proteína precursora beta-amilóide 400x.

4 Discussão

4.1 Discussão da Metodologia

4.1.1 Ultrassonografia como guia de punção

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

Em duas pesquisas realizadas em coelhos nos quais os fármacos foram administrados no espaço subaracnoideo com punção única, não foram observadas, à microscopia óptica, alterações histológicas do tecido nervoso medular na maioria dos animais que receberam solução fisiológica (doze coelhos)^{26,27}. Em apenas um deles foi constatada laceração intensa da medula espinal no local da punção, que foi realizada entre a última vértebra lombar e a primeira vértebra sacral²⁸.

Está descrito que no coelho, o espaço subaracnoideo pode ser abordado entre a primeira e a segunda vértebras sacrais, pela via paramediana, e que o volume do liquor é pequeno e não reflue através do canhão da agulha. Para diminuir a manipulação da agulha e, consequentemente, a possibilidade de trauma do tecido nervoso desencadeado

pela punção, o espaço subaracnoideo foi identificado com auxílio de estimulador de nervo periférico²⁶.

Estudo anatômico do sistema nervoso central do coelho (*Oryctolagus cuniculus*) mostra que o comprimento do cone medular pode estender-se da segunda a quarta vértebra sacral²⁸.

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

A utilização do ultrassom, em anestesia regional, facilitou a realização da técnica anestésica, permitindo a melhor visibilidade das estruturas a serem abordadas (nervos), assim como das adjacentes (vasos sanguíneos, pulmão, pleura). Possibilitou o posicionamento adequado da agulha, evitando-se lesão de nervo e injeção intravascular de anestésico local, além de possibilitar a observação da área de dispersão da solução injetada²⁹. Assim sendo, na presente pesquisa, a utilização do ultrassom como guia de punção permitiu a visibilidade do espaço subaracnoideo e a dispersão da solução administrada no interior deste espaço, mostrando que a técnica para a realização da punção não foi o fator que determinaria possíveis alterações no tecido nervoso da medula e nas meninges.

4.1.2 Grupos experimentais

O grupo 1, no qual foi realizada somente a punção subaracnoidea, teve por objetivo avaliar a segurança da técnica utilizada para a abordagem do espaço subaracnoideo

em não provocar acidente de punção. Como no local onde foi realizada a punção subaracnoidea ainda está presente o tecido nervoso medular²⁸, a agulha de punção não pode ocasionar trauma neste tecido.

Em nervos periféricos de coelhos, o trauma desencadeado pela introdução da agulha dentro dos fascículos desencadeou lesões neuronais graves³⁰. Foram observadas rotura intraneuronal, degeneração axonal distal e regeneração desorganizada das fibras nervosa após a introdução da agulha no interior de nervos periféricos de ratos³¹.

O grupo 2, o qual recebeu a solução fisiológica 0,9% por via subaracnoidea, em volume correspondente àquele de metotrexate (12 mg.m^2) administrado no grupo 3, teve por finalidade estudar os efeitos que o volume de solução administrada determinaria sobre o tecido nervoso. Alguns autores aventaram a hipótese de que aumentos agudos no volume do líquido poderiam levar ao aumento na pressão líquórica, comprometendo o fluxo sanguíneo medular e causando isquemia, com o surgimento de lesões neurológicas. Somando-se ao que já foi descrito, este grupo serviu também para excluir eventual injeção intraneural de solução. Está descrito na literatura que a injeção de solução salina, em volume de 0.05 mL, no interior dos fascículos de nervos periféricos de coelhos foi suficiente para degenerar os axônios^{30, 31}.

O grupo 3 recebeu o metotrexate na dose de 12 mg.m^2 (aproximadamente 0,1 mL) calculada pela fórmula de superfície corpórea (SC), ou seja:

$$SC = 0,007184 \times [\text{altura (cm)}^{0,725}] \times \text{peso (kg)}^{0,425}$$

Foi considerada altura, a distância entre a ponta do focinho e o início da cauda, medida pela face dorsal do animal.

4.2 Discussão dos resultados

O metotrexate é empregado pela via subaracnoidea como agente quimioterápico para o tratamento de leucemia e carcinomatose de leptomeninges^{32, 33}. Neurotoxicidade, na forma de leucoencefalopatia necrotizante disseminada, aracnoidite e axoniopatia multifocal podem ser resultado da administração subaracnoidea desta medicação^{34, 35}.

Achados histológicos *postmortem* de pacientes que foram submetidos à administração subaracnoidea de metotrexate mostraram alterações microvasculares, edema axonal e vários graus de perda de mielina, com resposta celular inflamatória mínima³⁶. Estas alterações predominantemente envolvem os extratos periféricos da substância branca da medula espinal.

A mais provável causa primária de neurotoxicidade desencadeada pelo metotrexate subaracnoideo é o efeito direto causado por este ao tecido nervoso, observado especialmente em pacientes que apresentam elevados níveis liquóricos do fármaco. Bleyer et al. observaram que os pacientes que apresentaram os mais elevados níveis liquóricos de metotrexate foram aqueles que mais frequentemente desenvolveram sinais de neurotoxicidade³⁷.

No presente modelo experimental, não foi encontrada associação entre a administração subaracnoidea do metotrexate e alterações neurológicas tanto clínicas quanto histológicas. De maneira similar, Weller et al.³⁸, observaram que o metotrexate em pequenas doses não desencadeava toxicidade em culturas de neurônios e astrócitos cerebelares e corticais de ratos. Gregorios et al.³⁹, por sua vez, encontraram alterações histológicas em ratos tratados com metotrexate pela via subaracnoidea e também

naqueles que não receberam o fármaco. Concluíram que as lesões eram próprias desses animais e não desencadeadas pelo quimioterápico.

Já Gilbert et al.⁴⁰ observaram que a exposição de fragmento cerebelar a 1 micromol de metotrexate por 2 semanas induziu perda axonal e desmielinização de neurônios. Constataram também, que a desmielinização foi mais pronunciada após exposição durante 5 semanas. Os oligodendrócitos tiveram sua função preservada, indicando que a desmielinização foi conseqüente à perda axonal. Entretanto, o mecanismo desencadeador da axonopatia permaneceu desconhecido.

As alterações histológicas advindas da terapia subaracnoidea com metotrexate não são muito bem conhecidas. Em animais de experimentação, o local em que a mielopatia ocorreu foi relacionado ao local em que o fármaco foi injetado no neuroeixo, sugerindo efeito tóxico direto em decorrência do menor “clearance” ou da depleção intracelular local do folato¹⁷.

Apesar de alguns estudos experimentais indicarem possíveis alterações do tecido nervoso desencadeadas pelo metotrexate, os casos documentados por necrópsia de pacientes com sintomas neurológicos após a utilização do fármaco são raros^{22, 39}. Isso se deve ao fato de que a maior parte dos pacientes se recupera espontaneamente após episódio agudo de sintomatologia neurológica. Somando-se a isso, quando há emprego concomitante de radioterapia pode haver tanto diminuição da inflamação, comprometendo a análise histológica dos resultados, quanto possível lesão direta no tecido nervoso.

Vários fatores podem estar relacionados com a ausência de alterações clínicas e histológicas do tecido nervoso e das meninges encontradas no presente estudo. Dentre estes fatores, podemos salientar a dose de metotrexate administrada nos animais, o

tempo total de cativeiro até seu sacrifício e os métodos de avaliação clínica e histológica empregados para a detecção de tais alterações.

A dose de metotrexate selecionada no presente estudo foi baseada naquela utilizada em seres humanos pela via subaracnoidea (12 mg.m^2)²¹. Esta dose foi extrapolada para os animais de forma direta, sendo que a dose total administrada em cada ciclo de quimioterapia subaracnoidea foi de 0,25 mg em cada animal. Existe a possibilidade de que esta dose não tenha sido suficiente para determinar alterações histológicas no tecido nervoso e nas meninges. Porém, doses menores do que estas (0,045 mg), marcadas radiologicamente com “tritium”, foram capazes de penetrar na medula espinhal, sendo que, após 1 hora da administração do fármaco, este se distribuiu de forma não homogênea pela substância gelatinosa e substância branca alcançando entre 67% e 99% da área espinal exposta³⁶.

Deve se considerar também que a distribuição subaracnoidea de metotrexate no SNC não é uniforme porque o metotrexate se difunde contra a corrente do liquor que vai dos ventrículos laterais, para o 3º e depois para o 4º ventrículos, e daí para o espaço subaracnoideo. Logo, somente 10% da dose administrada irão atingir os ventrículos laterais. O fármaco é bombeado para fora do liquor pelos transportadores ATP-ase (ABC), enquanto que os folatos naturais são ativamente concentrados¹⁴.

Poderia se inferir que o tempo em que os animais permaneceram em cativeiro tenha sido insuficiente para desencadear alterações histológicas nos tecidos do neuroeixo. Nesta pesquisa este período foi de 49 dias após a primeira dose administrada de metotrexate. Estes animais receberam outras três doses do fármaco, com intervalo entre as administrações de uma semana. Após a última dose de metotrexate

subaracnóideo, os animais permaneceram 21 dias adicionais em cativeiro até seu sacrifício.

Estudos experimentais pregressos em cães demonstraram que este tempo de cativeiro é suficiente para o desenvolvimento de alterações histológicas nas meninges, isto é aracnoidite adesiva, quando uma série de substâncias foram administradas no espaço subaracnóideo⁴¹⁻⁴³.

A aracnoidite adesiva apresenta quadro clínico complexo, com variedade de sintomas e de diagnóstico clínico difícil porque os sinais e sintomas não são específicos. As características clínicas mais freqüentes 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 urinário⁴⁴. Inicia-se como processo inflamatório da pia mater e da aracnóide associado ao edema e à hiperemia das raízes nervosas. Com a evolução da doença, faixas de colágeno começam a se formar entre a pia mater, a aracnóide e as raízes nervosas, culminando com a aderência entre estas estruturas. Nesta fase o edema das raízes começa a diminuir^{45,46}.

A aracnoidite adesiva crônica é a resolução do processo inflamatório crônico no qual se observa depósito denso de colágeno entre as raízes nervosas e as meninges. Há completo encapsulamento entre as raízes, levando a atrofia das mesmas e comprometimento dos vasos sanguíneos. Estudos histológicos mostraram vasos sanguíneos com arterite e discute-se se esta é a causa ou o resultado da aracnoidite. Alterações nas arteríolas, caracterizadas por inflamação e espessamento hialino, foram manifestações iniciais da aracnoidite adesiva desencadeada por contaminação da solução do anestésico local pelo antisséptico, em modelo experimental^{45, 46}.

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

A injeção subaracnoidea de betametasona, de metilprednisolona e do antidepressivo amitriptilina desencadeou aracnoidite adesiva em cães, alterações de meninges que foram observadas 21 dias após a administração subaracnoidea dos fármacos⁴¹⁻⁴³. Tendo por referências estes resultados, acreditamos que 49 dias após a dose inicial de metotrexate seriam suficientes para ocasionar lesões nas meninges.

Da mesma forma ao que ocorreu com a histologia do tecido nervoso medular e das meninges, a avaliação clínica realizada nos animais não detectou alterações de motricidade e sensibilidade que poderiam estar relacionadas à administração subaracnoidea de metotrexate. Entretanto, foi observado, que os coelhos do G3 (grupo Metotrexate) apresentaram-se emagrecidos e apáticos durante o período de cativeiro. Isto, por si só, pode ter comprometido a avaliação clínica destes animais. Seres humanos em tratamento quimioterápico também apresentam alterações similares, incluindo declínio intelectual e sonolência, que podem ser considerados efeitos neurológicos sutis¹⁴.

Está descrito na literatura que a análise dos resultados histológicos de lesões desencadeadas pelo metotrexate pode ser prejudicada quando se utiliza a técnica com hematoxilina e eosina. Esta pode demonstrar resultados normais mesmo nos casos em que há lesão grave. Como alternativa para detectar lesão axonal, foi proposta a análise imunohistoquímica da proteína precursora beta-amilóide²¹.

O metotrexate induz ruptura do fluxo axoplasmático anterógrado, causando acúmulo axonal da proteína precursora beta-amilóide, glicoproteína constituinte normal transmembrana. A lesão dos neurônios, como fragmentação de segmentos de axônios e acúmulo intracelular da proteína precursora beta-amilóide é indetectável pelas técnicas convencionais de HE²¹.

Os neurônios são células com necessidades metabólicas elevadas. O transporte axoplasmático é necessário para manter a estrutura e a função do axônio. O material sintetizado no corpo celular, como as proteínas e os precursores dos neurotransmissores, é conduzido até a terminação nervosa através do transporte axoplasmático rápido. Este parece ser dependente de túbulos e do metabolismo oxidativo do axônio. Toda alteração da síntese de proteínas ou de glicoproteínas modifica o transporte e pode determinar lesão neuronal, se esta alteração persistir⁴⁷.

A proteína precursora beta amiloide assim como outras proteínas transportadas pelo transporte axonal rápido anterógrado são utilizadas como marcadores precoces de lesão axonal. Após três horas que se segue a lesão do tecido nervoso é possível detectar o acúmulo da proteína precursora beta-amilóide, quando se utiliza a técnica imunohistoquímica. Quando são empregadas outras colorações, como por exemplo, aquela por prata, as lesões axonais (retrações do axônio) são visualizadas somente 24 h após a lesão⁴⁸⁻⁵⁰.

Como não foi possível detectar alterações histológicas no tecido nervoso e nas meninges, até mesmo quando foi empregada a técnica imunohistoquímica que permite avaliações precoces de lesão nervosa, pode-se inferir que a dose administrada neste experimento não exerceu efeitos deletérios sobre os tecidos do neuroeixo.

Limitação do estudo: a distribuição do metotrexate após a injeção subaracnoidea é ascendente¹⁴ e a avaliação imunohistológica do tecido nervoso cerebral poderia auxiliar a avaliação dos resultados.

5 Conclusão

Neste modelo experimental em coelhos, a administração subaracnoidea de doses múltiplas de metotrexate pela via subaracnoidea não desencadeou alterações histológicas sobre o tecido nervoso medular e as meninges.

6 Referências

1. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001 Sep;2(9):533-43.
2. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer.* 2002 Jan 1;97(1):72-81.
3. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2003 Jan-Feb;53(1):5-26.
4. Simmonds MA. Cancer statistics, 2003: further decrease in mortality rate, increase in persons living with cancer. *Cancer statistics: further decrease in mortality rate, increase in persons living with cancer.* *CA Cancer J Clin.* 2003 Jan-Feb;53(1):4.
5. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.
6. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). Estimativa de Incidência 2012. Rio de Janeiro: INCA. 2012.
7. Chabner BA, Longo DL. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 789p.
8. Chu E, DeVita VT Jr. *Cancer chemotherapy drug manual 2006.* 6th ed. Massachusetts: Jones & Bartlett, 2006.
9. De Vita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles and practice of oncology.* 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

10. Kufe D. Holland-Frei Cancer Medicine. 7th ed. Shelton: BC Decker, 2006.
11. Perez CA, Brady LW. Principles and practice of radiation oncology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
12. Pizzo PA, Poplack AG. Principles and practice of pediatric oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
13. Rosenberg SA. Principles and practice of the biologic therapy of cancer. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
14. Schmiegelow K. Advances in individual prediction of methotrexate toxicity: a review. Br J Haematol. 2009 Sep;146(5):489-503.
15. Skipper HE, Schabel FM Jr, Mellett LB, Montgomery JA, Wilkoff LJ, Lloyd HH, et al. Implications of biochemical, pharmacologic, and toxicologic relationships in the design of optimal therapy. Cancer Chemother Rep. 1970 Dec; 54(6):431-50.
16. Vezmar S, Becker A, Bode U, Jaehde U. Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. Chemotherapy. 2003 May;49(1-2):92-104.
17. Pascual AM, Coret F, Casanova B, Láinez MJ. Anterior lumbosacral polyradiculopathy after intrathecal administration of methotrexate. J Neurol Sci. 2008 Apr 15;267(1-2):158-61.
18. Jaradeh S. Cauda equine syndrome: a neurologist's perspective. Reg Anesth. 1993 Nov-Dec;18(6 Suppl):473-80.
19. De Tommaso O, Caporuscio A, Tagariello V. Neurological complications following central neuraxial blocks: are there predictive factors? Eur J Anaesthesiol 2002;19(10): 705-16.
20. Kane RE. Neurologic deficit following epidural or spinal anesthesia. Anesth Analg. 1981 Mar;60(3):150-61.

21. Moore BE, Somers NP, Smith TW. Methotrexate-related nonnecrotizing multifocal axonopathy detected by beta-amyloid precursor protein immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 2002 Jan;126(1):79-81.
22. Bruce-Gregorios JH, Agarwal RP, Oracion A, Ramirez A, Lin L. Effects of methotrexate on RNA and purine synthesis of astrocytes in primary culture. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1991 Nov;50(6):770-8.
23. Myers, RR, Sommer, C. Methodology for spinal neurotoxicity studies. *Reg Anesth*. 1993 Nov-Dec;18(6 Suppl):439-47.
24. Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurological outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology*. 1989 Jan;70(1):64-70.
25. Okagawa SR, Ganem EM, Marques ME, Castiglia YMM. Efeitos de concentrações crescentes de lidocaína hiperbárica, administradas no espaço subaracnóideo, sobre a medula espinhal e as meninges. Estudo experimental no cão. *Rev Bras Anesthesiol*. 2006 Jun;56(3):253-62.
26. Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, Austin E, Sumi SM. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology*. 1985 Oct;63(4):364-70.
27. Adams HJ, Mastri AR, Eicholzer AW, Kilpatrick G. Morphologic effects of intrathecal etidocaine and tetracaine on the rabbit spinal cord. *Anesth Analg*. 1974 Nov-Dec;53(6):904-8.
28. Santos ALQ, Lima EMM, Santana MIS. Length of spinal cord and topography of medular cone in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Biosc J (UFU)*. 1999; 15:45-62.
29. Ting PH, Antonakakis JG. Evidence-based review of ultrasound imaging for regional anesthesia. *Semin Anesth*. 2007 Dez; 26(4): 218-28.
30. Selander D, Brattsand R, Lundorf G, Nordborg C, Olsson Y. Local anaesthesia, importance of mode of application, concentration and adrenaline for the appearance

- of nerve lesions. An experimental study of axonal degeneration and barrier damage after intrafascicular injection or topical application on bupivacaine(marcaine^R). *Acta Anaesthesiol Scand*. 1979 Apr;23(2):127-36.
31. Rice AS, McMahon SB. Peripheral nerve injury caused by injection needles used in regional anaesthesia: influence of bevel configuration, studied in a rat model. *Br J Anaesth*. 1992 Nov;69(5):433-8.
 32. Hoffman MA, Valderrama E, Fuchs A, Friedman M, Rai K. Leukemic meningitis in B-cell prolymphocytic leukemia. *Cancer*. 1995 Mar 1;75(5):1100-3.
 33. Grossman SA, Krabak MJ. Leptomeningeal carcinomatosis. *Cancer Treat Rev*. 1999 Apr;25(2):103-19.
 34. Lacy CF, Armstrong LL, Goldman MP, Lance LL. *Drug Information Handbook 1999-2000*. Hudson, Ohio: Lexi-Comp Inc. 1999.
 35. Shapiro WR, Allen JC, Horten BC. Chronic methotrexate toxicity to the central nervous system. *Clin Bull*. 1980;10(2):49-52.
 36. Burch PA, Grossman SA, Reinhard CS. Spinal cord penetration of intrathecally administered cytarabine and methotrexate: a quantitative autoradiographic study. *J Natl Cancer Inst*. 1988 Oct 5;80(15):1211-6.
 37. Bleyer WA, Drake JC, Chabner BA. Neurotoxicity and elevated cerebrospinal fluid methotrexate concentration in meningeal leukemia. *N Engl J Med*. 1973 Oct11;289(15):770-3.
 38. Weller M, Marini AM, Finiels-Marlier F, Martin B, Paul SM. MK-801 and memantine protect cultured neurons from glutamate toxicity induced by glutamate carboxypeptidase-mediated cleavage of methotrexate. *Eur J Pharmacol*. 1993 Dec 1;248(4):303-12.
 39. Gregorios JB, Gregorios AB, Mora J, Marcillo A, Fojaco RM, Green B. Morphologic alterations in rat brain following systematic and intraventricular methotrexate

- injection: light and electron microscopic studies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1989 Jan;48(1):33-47.
40. Gilbert MR, Harding BL, Grossman SA. Methotrexate neurotoxicity: In vitro studies using cerebellar explants from rats. *Cancer Res*. 1989 May 1;49(9):2502-5.
 41. Barros GAM, Marques ME, Ganem EM. The effects of intrathecal administration of betamethasone over the dog's spinal cord and meninges. *Acta Cir Bras*. 2007 Sep-Oct;22(5):361-5.
 42. Lima RM, Barros GAM, Marques ME, Navarro LHC, Modolo NSP, Pimenta ADB, et al. Clinical and histological effects of the intrathecal administration of methylprednisolone in dogs. *Pain Physician*. 2010 Sep-Oct;13(5):493-501.
 43. Fukushima FB, Barros GAM, Marques ME, Vidal EIO, Ganem EM. The neuraxial effects of intraspinal amitriptyline at low concentrations. *Anesth Analg*. 2009 Sep;109(3):965-71.
 44. Rice I, Wee MY, Thomson K. Obstetric epidurals and chronic adhesive arachnoiditis. *Br J Anaesth*. 2004 Jan;92(1):109-20.
 45. Hoffman GS. Spinal arachnoiditis. What is the clinical spectrum? *Spine (Phila Pa 1976)*. 1983 Jul-Aug;8(5):538-40.
 46. Weston-Hurst E. Adhesive arachnoiditis and vascular blockage caused by detergents and other chemical irritants: an experimental study. *J Path Bact*. 1955; 70(1):167-78.
 47. Malinovsky JM, Pinaud M. Neurotoxicité des agents administres par voie intrathécale. *Ann Fr Anesth Reanim*. 1996;15(5):647-58.
 48. Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. *Acta Neuropathol*, 1994; 87(1):55-66.
 49. Sherriff FE, Bridges LR, Gentleman SM, Sivaloganathan S, Wilson S. Markers of axonal injury in post mortem human brain. *Acta Neuropathol*, 1994; 88(5):433-9.

50. Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, Graham DI, Roberts GW. Beta-Amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett*. 1993 Oct 1;160(2):139-44.