

**José Admirço Lima Filho**

**Efeitos da administração subaracnoidea em punção única,  
de cetamina S (+) a 5%, sem conservantes,  
sobre a medula espinal e as meninges de coelhos**

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

**Orientadora: Profa. Titular Eliana Marisa Ganem**

**Botucatu – SP**

**2014**

“Faça o necessário, depois o possível, e, de repente, você  
estará fazendo o impossível.”

***São Francisco de Assis***

Dedico este trabalho

à forma mais intensa de amor, a razão da minha existência:

*Minha Família*

Ofereço este trabalho

Aos meus filhos

*Miguel, Isaac e a pequenina Hannah.*

Dedico este trabalho à minha esposa

*Larissa.*

*“É errado pensar que o amor vem do companheirismo de longo tempo ou do cortejo perseverante. O amor é filho da afinidade espiritual e a menos que esta afinidade seja criada em um instante, ela não será criada em anos, ou mesmo em gerações.”*

*Khalil Gibran*

Aos meus pais,

*José e Maria.*

Aos meus irmãos,

*Fábio e Vinícius.*

*A retidão de caráter e exemplos de seres humanos aumentam a minha  
esperança de dias melhores! Obrigado, meu Deus, pelos pais e irmãos que  
posso!*

À professora

*Elíana Marísa Ganem,*

*Serei eternamente grato, a minha maior professora!*

*Muito obrigado!*

“Todo o trabalho é vazio a não ser que haja amor”.

***Khalil Gibran***

*Meus sinceros agradecimentos...*

*Aos docentes e funcionários do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela luta constante pela excelência da pesquisa médica. O farol de Alexandria na busca do conhecimento e crescimento da especialidade que amo;*

*aos meus pais exemplos de amor aos filhos;*

*aos amigos da CAS - Clínica de Anestesia de Salvador, pelos incentivos e apoio. Em especial aos Drs. Luciano Garrido, genial mestre; Carlos Eduardo Aragão, líder nato; Ricardo Azevedo, MEU exemplo de ética e profissionalismo. Dr. Herman Lopes e Dra. Elga Dourado pela amizade e companheirismo. Dr. Luís Cláudio e Anderson Gazineu pela intensa colaboração nas minhas substituições na escala de trabalho;*

*ao meu grande amigo Bruno Gardélio Cerqueira. De forma abnegada foi prestativo em oferecer a mão amiga e orientações;*

*aos meus irmãos Fábio e Vinícius pelas constantes mensagens de apoio;*

*à minha amiga, secretária da Clínica de Anestesia de Salvador, Stela, pelo apoio e incentivo;*

*ao meu grande amigo, sócio e irmão que Deus me ofereceu Hugo Dantas, pelos conselhos e visão crítica;*

*ao meu sogro, Ivan, pelo exemplo e dedicação à minha família;*

*aos alunos de graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu Natália Castro Fim e Felipe Gilberto Valerine e à residente do Departamento de Anestesiologia Isabela Leite Ferraz, pelo auxílio na execução da pesquisa experimental;*

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

*à Profa. Adjunta Mariângela Esther Alencar Marques, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio na leitura das lâminas histológicas;*

*ao Prof. Dr. Hélio Miott, do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo auxílio na avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos;*

*ao PIBIC/CNPq e à FAPESP pela concessão de bolsas de Iniciação Científica aos alunos de graduação.*

Lima Filho JA. Efeitos da administração subaracnoidea em punção única, de cetamina S (+) a 5%, sem conservantes, sobre a medula espinal e as meninges de coelhos. Botucatu, 2014. 60p. Tese (Doutorado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

## **Resumo**

**Introdução** O alívio da dor é uma das atribuições do anestesiológico. Dentre os fármacos utilizados com esta finalidade inclui-se a cetamina (bloqueador do receptor N-metil D aspartato). Ela pode ser administrada por diversas vias dentre as quais a subaracnoidea e a peridural. Resultados de pesquisas clínicas e experimentais mostraram que a cetamina S (+) foi eficaz no alívio da dor pós-operatória quando introduzida no espaço peridural. Contudo, ainda pouco se sabe sobre sua administração no espaço subaracnoideo. Foram descritas lesões neurológicas no tecido medular de seres humanos e animais quando se utilizou a cetamina com conservantes, no espaço subaracnoideo e, as mesmas lesões foram descritas, em animais, com o fármaco desprovido de conservantes. **Objetivo:** avaliar os efeitos que a cetamina S (+) a 5% sem conservantes, administrada pela via subaracnoidea em punção única, determina sobre a medula espinal e as meninges de coelhos. **Método:** Vinte coelhos adultos jovens, fêmeas, pesando entre 3500 a 5000 gr com comprimento de coluna vertebral entre 34 e 38 cm foram divididas, por sorteio, em dois grupos (G): G1 solução fisiológica 0,9%, G2 cetamina S (+) 5% em volume de 5µg por cm de coluna (1,8 µl). Após anestesia venosa com cetamina e xilazina foi realizada punção subaracnoidea em S1-S2 guiada por ultrassom e injetada a solução sorteada. Os animais permaneceram em cativeiro por 21 dias sob observação clínica e foram sacrificados por decapitação e retirada a porção lombo-sacral da medula espinal para exame histológico [Hematoxilina e eosina (HE) e imuno-histoquímica para proteína glial fibrilar ácida (GFAP)]. **Resultados:** nenhum animal apresentou lesão histológica de tecido nervoso (raízes e medula) e meninges. **Conclusão:** Neste modelo experimental em coelhos a cetamina S (+) 5% sem conservante não desencadeou lesão neurológicas ou histológica na medula espinal e meninges.

**Palavras-chave:** cetamina S (+) sem conservante, coelhos, injeção subaracnoidea.

Lima Filho JA. Effects of ketamine S (+) 5% preservative free, administered by the intrathecal route in single puncture, determines on the spinal cord and meninges of rabbits. Botucatu, 2014. 60p. Thesis (PhD degree in Anesthesiology), Botucatu Medical School, UNESP.

## **Abstract**

**Background:** Pain relief is one of the tasks of the anesthesiologist . Among the drugs used for this purpose include the ketamine (blocker of N-methyl D aspartate receptor). It can be administered by various routes among which spinal and epidural. Results of clinical and experimental studies have shown that ketamine S (+) was effective in relieving postoperative pain when introduced into the epidural space. Almost nothing is known about his administration in the subarachnoid space. Neurological lesions were described in the medullary tissue of humans and animals when using ketamine S(+) 5% preservative free, the subarachnoid space, the same lesions have been reported in animals with the drug devoid of preservatives. **Objective:** To evaluate the effects of ketamine S (+) 5% preservative free, administered by the intrathecal route in single puncture , determines on the spinal cord and meninges of rabbits. **Method:** Twenty young adult female rabbits, weighing 3500-5000 g with entre34 spine length and 38 cm were divided by lot into two groups (G ): 0.9% saline G1 , G2 ketamine S (+) 5% by volume of 5µg per cm column (1,8 µl). After intravenous anesthesia with ketamine and xylazine spinal puncture was performed in S1 - S2 ultrasound guided and injected a random solution. The animals remained in captivity for 21 days under medical observation and were sacrificed by decapitation and removal of the lumbosacral portion of the spinal cord for histologic examination [hematoxylin and eosin (HE)] and immunohistochemistry for glial fibrillary acidic protein (GFAP). **Results:** No animal showed histological lesions of nerve tissue (roots and cord) and meninges. **Conclusions:** In this experimental model in rabbits ketamine S (+) 5% preservative free triggered no neurological or histological lesions in the spinal cord and meninges.

**Key words:** ketamine S (+) preservative free, rabbits, intrathecal injection

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Segmento da região posterior da medula espinal. GFAP 200x. Exemplo de área utilizada para estimar o percentual de células marcadas.....	33
<b>Figura 2</b>	A. Área selecionada do tecido neural. B. Área binarizada após o processamento da imagem, resultando em 45% do tecido marcado.....	34
<b>Figura 3</b>	<i>Box-Plot</i> da mediana e 1º e 3º quartis do percentual das células do tecido nervoso marcadas pelo GFAP dos grupos estudados...	38
<b>Figura 4</b>	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais. HE 40x. Grupo 1.....	39
<b>Figura 5</b>	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais. HE 100x. Grupo 1.....	39
<b>Figura 6</b>	Tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges normais. GFAP 40x. Grupo 1.....	40
<b>Figura 7</b>	Tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges normais. GFAP 100x. Grupo 1.....	40
<b>Figura 8</b>	Tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges normais. HE 40x. Grupo 2.....	41
<b>Figura 9</b>	Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais. HE 100x. Grupo 2.....	41
<b>Figura 10</b>	Tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges normais. GFAP 40x. Grupo 2.....	42
<b>Figura 11</b>	Tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges normais. GFAP 100x. Grupo 2.....	42

## Lista de Quadros e Tabelas

<b>Quadro 1</b>	Algoritmo de processamento das imagens para quantificação imunohistoquímica.....	34
<b>Tabela 1</b>	Peso (kg), comprimento de coluna (cm) e volume administrado (ml) dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais.....	38

## Sumário

1 Introdução.....	15
2 Objetivo.....	22
3 Material e Método.....	24
3.1 Animais utilizados.....	25
3.2 Grupos experimentais.....	25
3.3 Sequência experimental.....	25
3.4 Técnicas utilizadas.....	26
3.5 Punção subaracnoidea.....	27
3.6 Observação clínica.....	28
3.7 Sacrifício dos animais.....	29
3.8 Exame histológico.....	29
3.9 Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	35
3.10 Modelo de estudo.....	35
3.11 Método estatístico.....	35
4 Resultados.....	36
5 Discussão.....	47
5.1 Discussão da metodologia.....	44
5.2 Discussão dos resultados.....	44
6 Conclusão.....	50
7 Referências.....	52

# *1 Introdução*

A Associação Internacional para o Estudo da Dor, após sucessivas tentativas para conceituar dor, definiu-a como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a lesões teciduais reais ou potenciais ou descritas em termos de tais lesões”<sup>1</sup>.

A dor possui caráter subjetivo podendo ser classificada, quanto às características temporais, em aguda ou crônica e, quanto à fisiopatologia, em nociceptiva ou neuropática<sup>1</sup>.

A sequência inicial dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação pelos nociceptores que, a partir das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o sistema nervoso central<sup>2</sup>.

Os receptores específicos para dor, ou seja, nociceptores, estão localizados nas terminações de fibras nervosas A delta e C, sendo a segunda responsável por 70% a 80% da aferência sensitiva<sup>3,4</sup>. Os nociceptores estão presentes em estruturas superficiais da pele, na parede de vísceras, nos vasos sanguíneos e no sistema musculoesquelético, possuindo a capacidade de transmitir os estímulos dolorosos em diferentes velocidades. Além disso, as terminações nervosas das fibras nociceptivas A delta e C são capazes de responder a mediadores inflamatórios, estímulos mecânicos, térmicos e químicos, traduzindo tais agressões em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado, no córtex cerebral, como dor<sup>5,6</sup>.

A sensibilização dos nociceptores ocorre por diminuição do limiar de excitabilidade<sup>7</sup>, decorrente da liberação de substâncias químicas, denominadas algio gênicas, presentes no ambiente tissular<sup>8</sup>, como bradicinina, acetilcolina, prostaglandinas, histamina, serotonina, leucotrienos e substância P, fator de ativação plaquetário, radicais ácidos, íons potássio, tromboxanas, interleucinas, fator de necrose

tumoral<sup>5,6</sup>, dentre outros. Os nociceptores podem ser sensibilizados ainda por influências noradrenérgicas, provenientes de eferências simpáticas e, também, pela liberação retrógrada de neurotransmissores pelas fibras nervosas<sup>1</sup>.

A liberação desses neurotransmissores, na medula espinal, gera potenciais pós-sinápticos excitatórios que podem ser lentos (conduzidos pelas fibras C) ou rápidos (conduzidos pelas fibras A delta), ativando receptores específicos, dentre eles os envolvidos no mecanismo de ação dos aminoácidos, como os receptores N-metil D-aspartato (NMDA) o qual é ativado pelo glutamato e modulado pela substância P, promovendo o aumento de cálcio intracelular e a remoção do íon magnésio do interior do receptor, do que resulta à amplificação e o prolongamento da resposta ao impulso doloroso<sup>9,10</sup>.

O aumento do cálcio intracelular ativa a enzima óxido nítrico sintetase, que age como segundo mensageiro via guanosina monofosfato cíclico (GMPC), ativando proteinocinases, responsáveis pela fosforilação e ativação dos canais iônicos, além de difundir-se de modo retrógrado para o terminal pré-sináptico e estimular a liberação de glutamato<sup>1</sup>. Além disso, ocorre a estimulação da transcrição de protooncogenes, localizados no sistema nervoso central, que estão envolvidos na formação de encefalinas e dimorfinas<sup>11,12</sup>.

Nos neurônios espinais, o aumento na concentração do cálcio promove a ativação da fosfolipase C e fosfolipase A2. A primeira catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol bifosfato<sup>4,5</sup>, gerando a formação de trifosfato de inositol e diglicerol, ambos atuando como segundos mensageiros. O segundo catalisa a conversão da fosfatidilcolina em ácido araquidônico produzindo prostaglandinas<sup>1</sup>.

Portanto, a ativação dos receptores NMDA é, em última análise, o mecanismo principal da sensibilização do corno posterior da medula espinal, caracterizado por atividade espontânea, redução do limiar ou aumento da resposta a impulsos aferentes, descargas prolongadas após estímulos repetidos e expansão dos campos receptivos de neurônios da medula espinal<sup>1</sup>.

A cetamina, agente anestésico conhecido há aproximadamente quarenta anos, é derivada da fenciclidina e produz amnésia, analgesia e anestesia dissociativa, sendo empregada em anestesia desde a década de 1970<sup>13,14</sup>.

A cetamina foi inicialmente sintetizada como mistura racêmica, contendo partes iguais de cetamina levógira (S) e destrógira (R), o que ocasionou muitas reações indesejáveis, tais como delírios e alucinações<sup>13,14</sup>.

Na década de 1990, foi sintetizada a cetamina S (+) que apresenta quatro vezes mais estereosseletividade pelo receptor NMDA, possui maior potência analgésica e anestésica e apresentando menos efeitos colaterais, o que possibilitou seu emprego como adjuvante em anestesia<sup>13,14</sup>.

Os mecanismos de ação da cetamina compreendem o bloqueio de forma competitiva dos receptores NMDA, o bloqueio não competitivo dos receptores NMDA próprios ao glutamato e a interação com receptores opioides tanto espinais como supra-segmentares<sup>13,14</sup>.

Também pode ser citada a ação do fármaco em receptores colinérgicos, muscarínicos e nicotínicos e em receptores monoaminérgicos, ativando as vias descendentes monoaminérgicas e serotoninérgicas inibitórias do processo nociceptivo. A cetamina ainda bloqueia dos canais de sódio voltagem-dependentes da fibra neural<sup>13,14</sup>.

Clinicamente, a cetamina tem seu emprego indicado em algumas situações clínicas como instabilidade hemodinâmica, para sedação em paciente não cooperativo, em doença asmática ativa e em pacientes queimados. Atualmente, a cetamina S (+) pode ser utilizada como agente único ou associada a outros anestésicos<sup>13,14</sup>.

Suas vias de administração são a intradérmica, subcutânea, intramuscular, intravenosa, retal, intranasal, oral, peridural e subaracnoidea<sup>13,14</sup>.

Quando administrada pela via intravenosa, em baixas doses, produz analgesia satisfatória, evidenciando a inibição do sistema nociceptivo, com bloqueio da hipersensibilidade central. A via peridural também pode ser utilizada para o controle da dor pós-operatória, sendo que em ambas os efeitos analgésicos são considerados satisfatórios<sup>13,14</sup>.

Em revisão, série de estudos clínicos mostrou que a cetamina racêmica produziu analgesia intensa após a administração nos espaços subaracnoideo e peridural<sup>15</sup>.

O fármaco, quando introduzido no espaço peridural em infusão contínua, foi eficaz no alívio da dor e não ocasionou efeitos adversos, como depressão respiratória, retenção urinária e prurido, que são comumente observados após a injeção de opioides<sup>16</sup>.

Pela via subaracnoidea, a cetamina é utilizada para o tratamento do câncer e da dor neuropática<sup>17-19</sup>.

Os resultados dos estudos clínicos publicados na literatura mostraram-se conflitantes quanto aos efeitos da cetamina administrada no espaço subaracnoideo para o alívio da dor aguda, como adjuvante da anestesia<sup>20,21</sup>.

Alguns autores observaram que a cetamina S (+) foi eficaz no tratamento de dor de origem inflamatória<sup>22</sup>, outros mostraram que, associada ao anestésico local, havia diminuição na latência e na duração de ação do bloqueio<sup>23</sup>. Yanli e Eren<sup>24</sup> não observaram diminuição na latência, quando utilizaram a cetamina racêmica e Weir e Fee<sup>25</sup> não encontraram benefício quanto à qualidade da analgesia. Unlugenc et al.<sup>20</sup>, por outro lado, obtiveram diminuição de latência e prolongada analgesia sem o aumento na duração de ação.

Apesar da considerável experiência clínica, ainda há controvérsia sobre a segurança da cetamina administrada pela via subaracnoidea<sup>22</sup>. Isto se deve ao potencial de toxicidade do agente, decorrente da presença de conservantes contidos nas soluções (cloreto de benzetônio e clorobutanol)<sup>26-28</sup>.

Em modelo experimental com coelhos, Borgbjerg et al.<sup>29</sup> não observaram efeitos tóxicos sobre os tecidos nervosos quando administraram cetamina racêmica desprovida de conservante por quatorze dias consecutivos. Resultados similares também foram observados em coelhos, em injeção única<sup>30</sup>, e em macacos<sup>27</sup>. Contudo Vranken et al.<sup>30</sup>, após a injeção subaracnoidea de cetamina S (+) sem conservantes, em injeções sequenciais durante sete dias, observaram lesões histológicas no tecido nervoso compatível com neurotoxicidade.

Em cães nos quais foram administradas, no espaço subaracnoideo, doses de 1 mg.kg<sup>-1</sup> de cetamina S (+) sem conservantes em concentrações variáveis não foram observadas lesões histológicas na medula, nas raízes da cauda equina e nas meninges<sup>31</sup>.

Quando se propõe estudar neurotoxicidade, a seleção da espécie animal deve ser realizada com cuidado, especialmente se os resultados obtidos serão extrapolados para os seres humanos<sup>32</sup>. Por exemplo, no rato o espaço subaracnoideo possui tamanho

limitado, o que provoca menores diluições e misturas dos fármacos no liquor, favorecendo o maior contato da substância estudada com o tecido nervoso, podendo induzir resultados superestimados. Já o cão, cujo espaço subaracnoideo é comparável ao dos seres humanos, é uma boa espécie para estudar neurotoxicidade<sup>33</sup>.

Desde meados do século passado utilizam-se coelhos para estudo de neurotoxicidade. Diversos autores pesquisaram, nesta espécie, os efeitos de anestésicos locais<sup>34-41</sup>, dos benzodiazepínicos<sup>42,43</sup>, de anticolinesterásicos<sup>43</sup>, de antagonistas do receptor N-metil-D-apartato<sup>25,27</sup>, dentre outras soluções<sup>44</sup>.

Na grande maioria destas pesquisas, a solução foi introduzida no espaço subaracnoideo por meio de cateter implantado de forma crônica<sup>29,32-39,42-44</sup> e, em alguns estudos, foram observadas, nos animais do grupo controle, células inflamatórias nas meninges<sup>29,35</sup> e no tecido nervoso<sup>35</sup> ao redor do cateter. Também foram constatadas alterações neuroimunes que se manifestaram pelo aumento de marcadores gliais e pela expressão de citocinas específicas<sup>45</sup>.

A presença de um cateter no espaço subaracnoideo e o tempo de implantação do mesmo podem comprometer a administração do fármaco e as respostas desencadeadas pelo agente estudado<sup>46,47</sup>. Somando-se a isto, a cateterização crônica do espaço subaracnoideo e do peridural produz alterações histológicas no tecido nervoso medular, em torno do cateter<sup>48,49</sup>. Alguns autores<sup>29</sup> afirmaram que estas alterações são facilmente distinguíveis daquelas determinadas pelos efeitos tóxicos das soluções estudadas e que a técnica de injeção subaracnoidea com punção única também induziu ao edema das raízes nervosas, em macacos<sup>27</sup>.

Estudos experimentais que utilizam a injeção subaracnoidea com punção única para a introdução de soluções são aqueles cuja técnica mais se aproxima dos procedimentos anestésicos empregado na prática clínica.

## 2 *Objetivo*

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos que a cetamina S (+) a 5% sem conservantes, administrada pela via subaracnoidea em punção única, determina sobre a medula espinal e as meninges de coelhos.

### *3 Material e Método*

### 3.1 Animais utilizados

Após a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo nº 801), foram utilizados 20 coelhos adultos jovens, fêmeas, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 3.500 gramas e 5.000 gramas e comprimento de coluna entre 34 e 38 centímetros, fornecidos pelo Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

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

Os animais foram randomizados em dois grupos experimentais.

### 3.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais, com 10 animais em cada grupo, submetidos, inicialmente, à anestesia venosa com xilazina e cetamina e, em seguida, à punção subaracnoidea. Os grupos diferenciaram-se pelo tipo de solução administrada, ou seja:

Grupo 1 (G1) – Controle de volume – solução fisiológica a 0,9%

Grupo 2 (G2) – Controle de fármaco – cetamina S (+) a 5%, sem conservantes

### 3.3 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.
- Medida do comprimento da coluna vertebral.
- Limpeza local com água e sabão.
- Tricotomia.
- Limpeza do local com solução salina fisiológica estéril.
- Antissepsia com gluconato de clorexidina a 2%.
- Colocação de campo estéril.
- Palpação e identificação dos espaços intervertebrais.
- Punção subaracnoidea sob orientação de ultrassom.
- Injeção da solução sorteada.
- Retirada do animal da mesa.
- Observação clínica após a recuperação da anestesia venosa.
- Manutenção em cativeiro durante 21 dias sob observação clínica.
- Sacrifício do animal.
- Remoção da medula espinhal em sua porção lombar e sacral.
- Fixação da peça anatômica.
- Análise da histologia

### **3.4 Técnicas utilizadas**

#### ***3.4.1 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  $3 \text{ mg.kg}^{-1}$  de peso corporal, e cloridrato de cetamina, na dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  de peso corporal.

- Após a anestesia venosa, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre mesa cirúrgica e obtido o comprimento da coluna vertebral medido pela distância entre a base do crânio ao espaço lombossacral.
- Foi realizada a limpeza da pele e pêlos da região da coluna vertebral com água e sabão seguida de tricotomia em área de 20 cm ao redor do local onde foi 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.

### **3.5 Punção subaracnoidea**

#### ***3.5.1 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 11/2", por acesso mediano, com ângulo de inclinação de aproximadamente 45°C. A agulha foi introduzida lentamente, em direção cefálica, guiada por ultrassom, até penetrar o espaço subaracnoideo.

Após a obtenção do espaço subaracnoideo os animais de G1 e de G2 receberam as soluções correspondentes. Foram registradas as dificuldades na realização da punção.

### ***3.5.2 Volume injetado***

Foram administrados 5µl por centímetro de coluna vertebral (1,8 µl), injetados em um segundo, em seringa de 1 ml, descartável.

### ***3.5.3 Solução administrada***

A solução fisiológica 0,9% (Grupo 1) e a cetamina S (+) 5%, sem conservantes (Grupo 2), sintetizada pela indústria farmacêutica Cristália, foram as soluções utilizadas.

## **3.6 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 ao bloqueio motor e à sensibilidade dolorosa. O bloqueio motor foi avaliado pela observação clínica, baseado no critério estabelecido por Drummond e Moore<sup>50</sup> 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 dermatômos sacrais, lombares, torácicos e da orelha com auxílio de pinça dente de rato.

Os animais permaneceram em cativeiro durante 21 dias, sob observação clínica. Foram verificadas as alterações motoras utilizando-se o critério de Drummond e Moore<sup>50</sup>. 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.

### **3.7 Sacrifício**

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

### **3.8 Exame histológico**

As peças anatômicas permaneceram, durante sete dias, em solução de formalina. Os cortes transversais do tecido nervoso e das meninges iniciaram, aproximadamente, dez centímetros acima do local onde foi realizada a punção

subaracnoidea, estendendo-se até o final da cauda equina, em intervalos de meio centímetro. Os cortes do tecido foram colocados em blocos de parafina e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) e para proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

### ***3.8.1 Técnica imuno-histoquímica para GFAP***

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

A próxima etapa realizada foi o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos em temperatura ambiente, 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 Trilogy (Cell Marque).

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

anticorpos secundário e terciário Hídef Polímero (Cell Marque) durante 10 minutos, cada uma das incubações, em temperatura ambiente.

Os cortes novamente lavados em PBS foram revelados pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina (Cell Marque) e após a revelação foram lavados em água corrente e contra corados em hematoxilina segundo Harris (MERCK) por 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.

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

- Tipo de lesão: 1 - aracnoidite; 2 - aracnoidite + lesão nervosa; 3 - lesão nervosa.
- Localização da lesão: 1 - região posterior (P); 2 - região lateral (L); 3 - região anterior (A); 4 - P+ L; 5 - L+A; 6 - P+L+A.
- Extensão da lesão: 1 - <10%; 2 - 10-50%; 3 - >50%.
- Profundidade da lesão: 1 - substância branca; 2 - substância cinzenta; 3 - substâncias branca e cinzenta.
- Vaso sanguíneo: 1 - normal; 2 - espessamento fibroso; 3 - trombose.

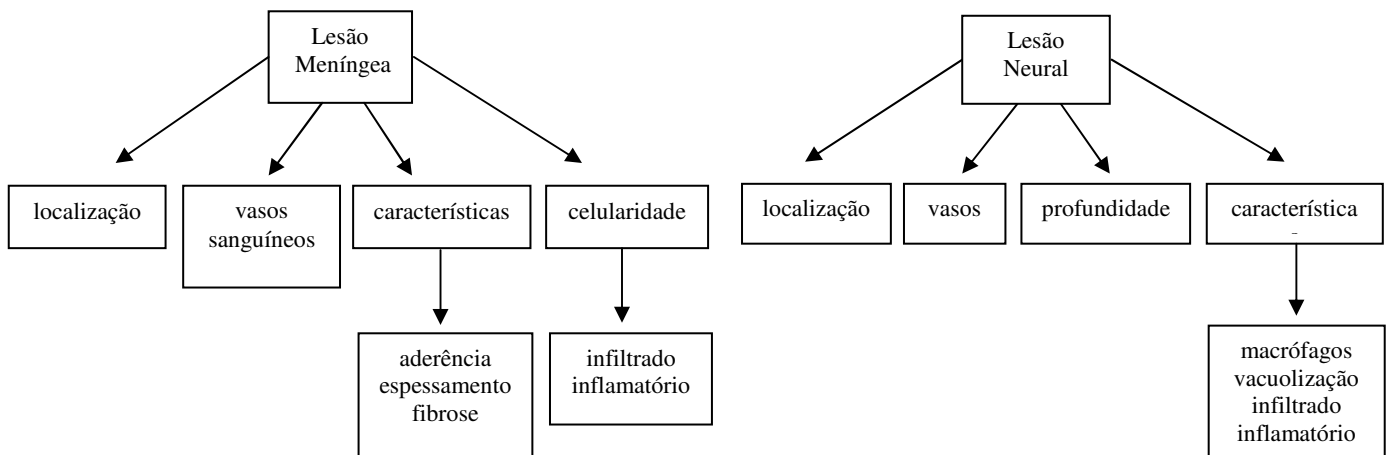
Na presença de aracnoidite adesiva:

- Aderência: 0 - ausente; 1 - dura mãe (D) + aracnóide (A); 2 - A + pia mãe (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.

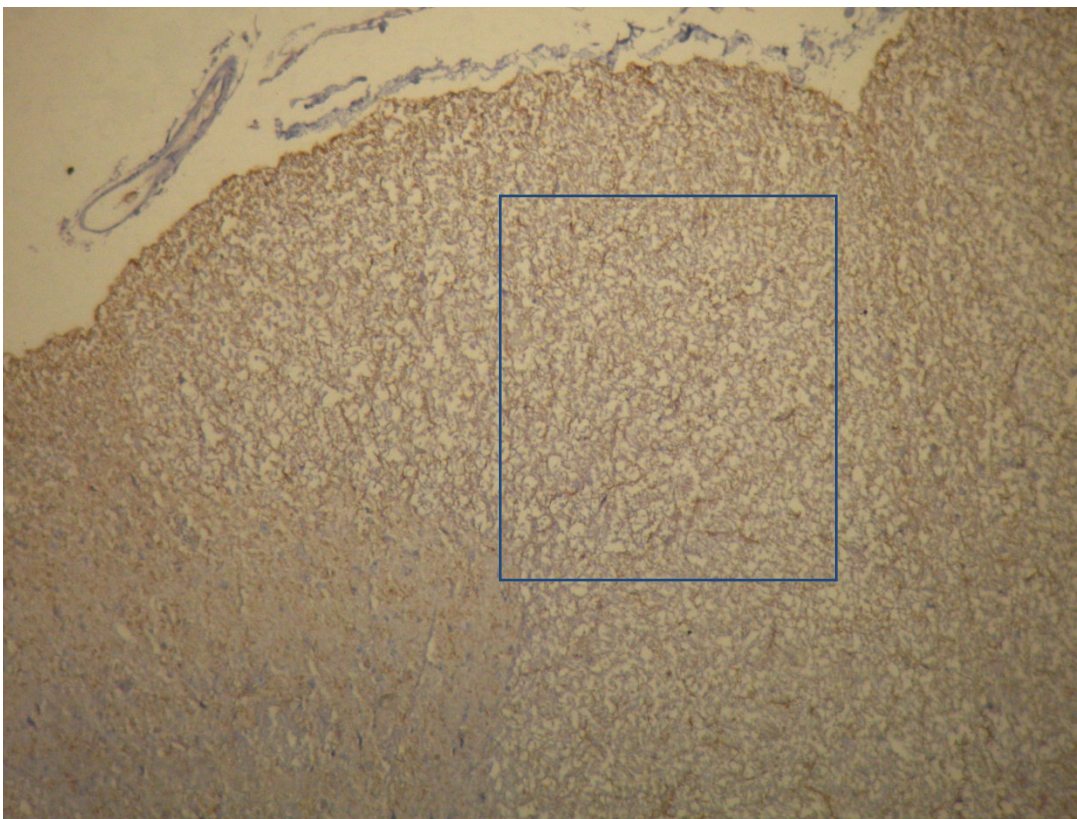
A avaliação dos resultados histológicos foi encoberta, realizada por três pesquisadores envolvidos no estudo.



Organograma da avaliação histológica

Para análise aprofundada da celularidade medular foi estimada a contagem de núcleos celulares a partir da avaliação da área imuno-histologicamente marcada pelo GFAP no corno dorsal da medula (Figura 1). Para tanto os cortes histológicos corados pelo GFAP, após serem fotografados em resolução 1600x1200 tipo JPG, 24 bits de cor foram submetidos a processamento digital segundo algoritmo (Quadro 1), empregando o software Image J 1.46 e o *plugin* “Color Deconvolution”.

As imagens foram, inicialmente, separadas por seus vetores componentes da hematoxilina e DAB pelo *plugin* “Color deconvolution” (H-DAB). Após isso, foi selecionada uma área retangular do tecido e realizado o aumento do contraste, de forma padronizada, para a binarização da imagem.



**Figura 1** - Segmento da região posterior da medula espinal. GFAP 200x. Exemplo de área utilizada para estimar o percentual de células marcadas.

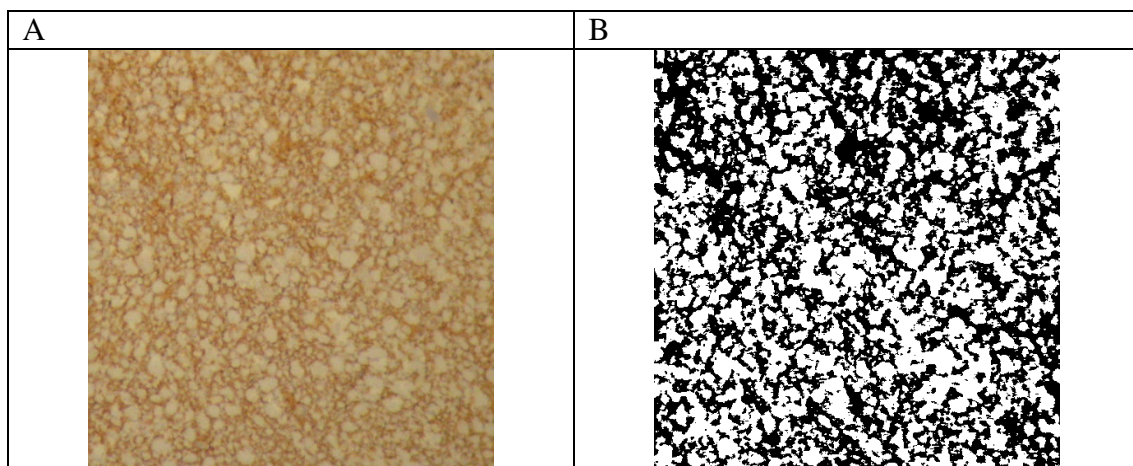
```

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

```

**Quadro 1** - Algoritmo de processamento das imagens para quantificação imuno-histoquímica.

Foi avaliado o percentual da área da imagem binarizada equivalente aos pixels do tecido marcado pelo DAB (Figura 2) e comparadas as amostras entre os grupos<sup>51-53</sup>.



**Figura 2** - A. Área selecionada do tecido neural. B. Área binarizada após o processamento da imagem, resultando em 45% do tecido marcado.

### **3.9 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.

### **3.10 Modelo de estudo**

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

Os grupos foram randomizados a partir de lista gerada por computador e por envelopes selados. A preparação das soluções administradas nos animais de G1 e G2 foi realizada por pesquisador não envolvido diretamente na realização da técnica.

### **3.11 Método estatístico**

Tendo como objetivo avaliar a homogeneidade dos grupos com relação ao peso, ao comprimento de coluna e ao volume da solução administrada no espaço subaracnoideo, foi realizado, como método estatístico, o teste t de Student (resultados expressos em média e desvio padrão), e para comparar os resultados dos percentuais das marcações histológicas das células pelo método do GFAP o teste não paramétrico de Mann-Whitney (resultados apresentados em mediana e 1º e 3º quartis) sendo considerado significativos os valores de  $p < 0,05$ .

Pressupondo-se uma estimativa de taxa de lesão do tecido nervoso de 70% e de taxa induzida de 1%<sup>54</sup> para a solução fisiológica, para um valor  $\alpha$  de significância de 5% (limite para detecção de erro tipo I) e um poder de 95%, foram necessários oito animais por grupo.

## 4 *Resultados*

A análise estatística dos valores referentes ao peso dos animais do grupo 1 foram inferiores ao do grupo 2 ( $p=0,02$ ). Houve homogeneidade entre os grupos com relação ao comprimento de coluna vertebral ( $p=1,0$ ), ao volume de solução administrada ( $p= 0,67$ ) (Tabela 1).

Nenhum animal foi excluído do experimento por dificuldade na realização da punção ou morte durante o período de cativeiro. O tempo de recuperação da anestesia venosa foi de aproximadamente 30 minutos ao final do qual todos os animais apresentavam motricidade e sensibilidade dolorosa preservadas. Os animais permaneceram clinicamente normais durante o período de cativeiro.

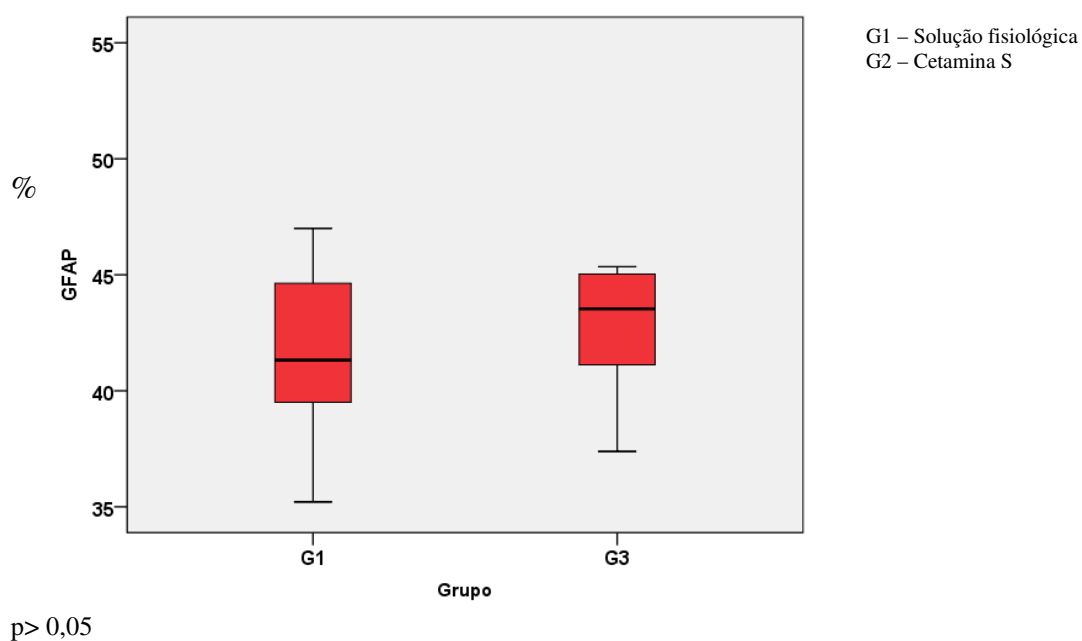
Nenhum animal de ambos os grupos apresentou alterações histológicas no tecido nervoso, nos vasos e nas meninges à microscopia óptica (Figuras 4 a 11).

Ambos os grupos foram similares com relação às análises do percentual do número de células marcadas do corno posterior marcadas pelo GFAP ( $p=0,48$ ) (*Box Plot*) A mediana do percentual do número de células do grupo controle foi 42%, com quartis 39% e 45% e do grupo da cetamina, mediana de 43% e quartis 41% e 45% (Figura 3).

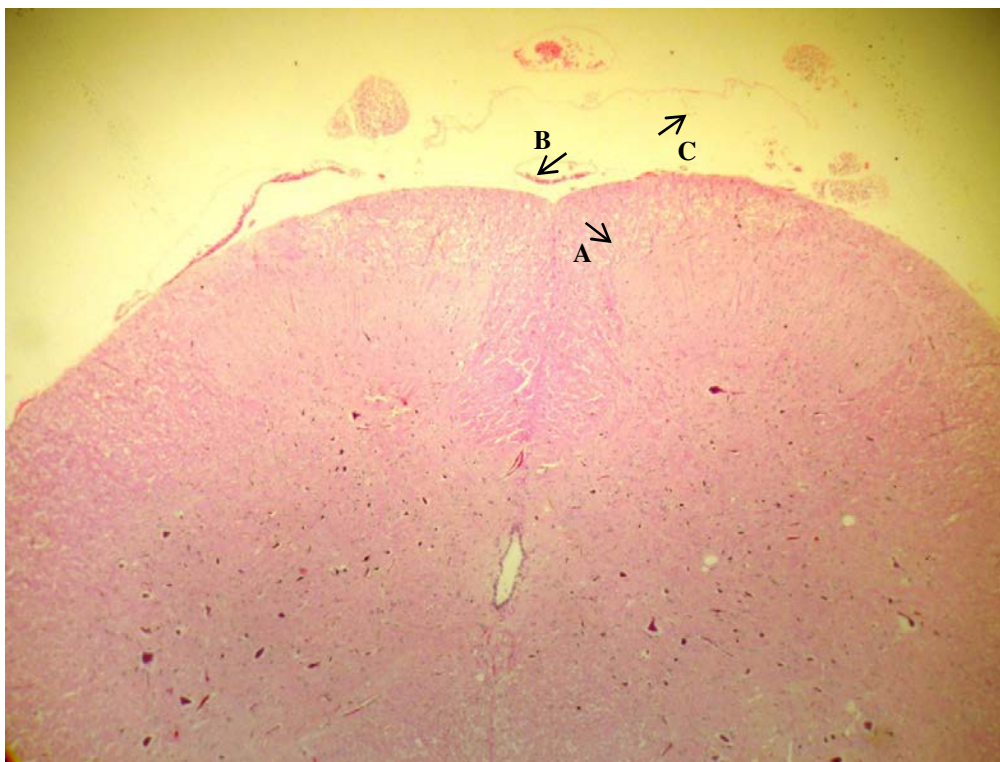
**Tabela 1** – Peso (kg), comprimento de coluna (cm) e volume administrado ( $\mu\text{l}$ ) de cetamina e de soro fisiológico dos animais pertencentes aos dois grupos experimentais. Resultados expressos em média e desvio padrão

	Grupo 1	Grupo 2
Peso (g)	$3.860 \pm 259$	$4.410 \pm 515^*$
Comprimento de coluna (cm)	$36,2 \pm 1,5$	$36,2 \pm 0,6$
Volume administrado ( $\mu\text{l}$ )	$1,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,03$

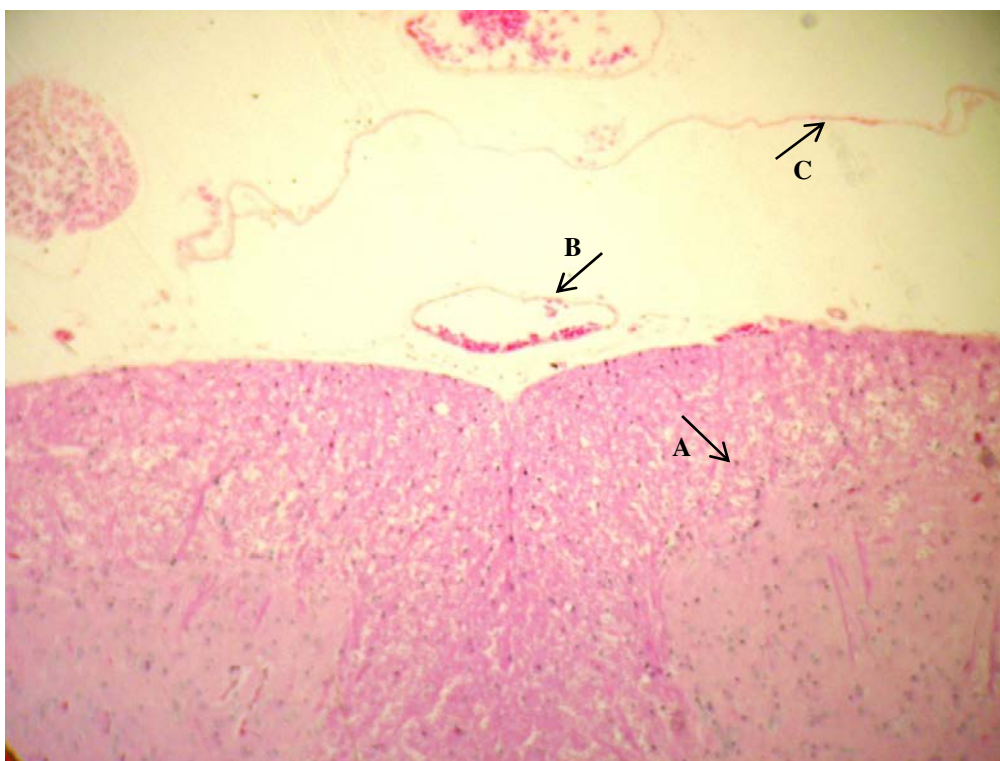
\*p = 0,02



**Figura 3** - Box-Plot da mediana e 1º e 3º quartis do percentual das células do tecido nervoso marcadas pelo GFAP dos grupos estudados



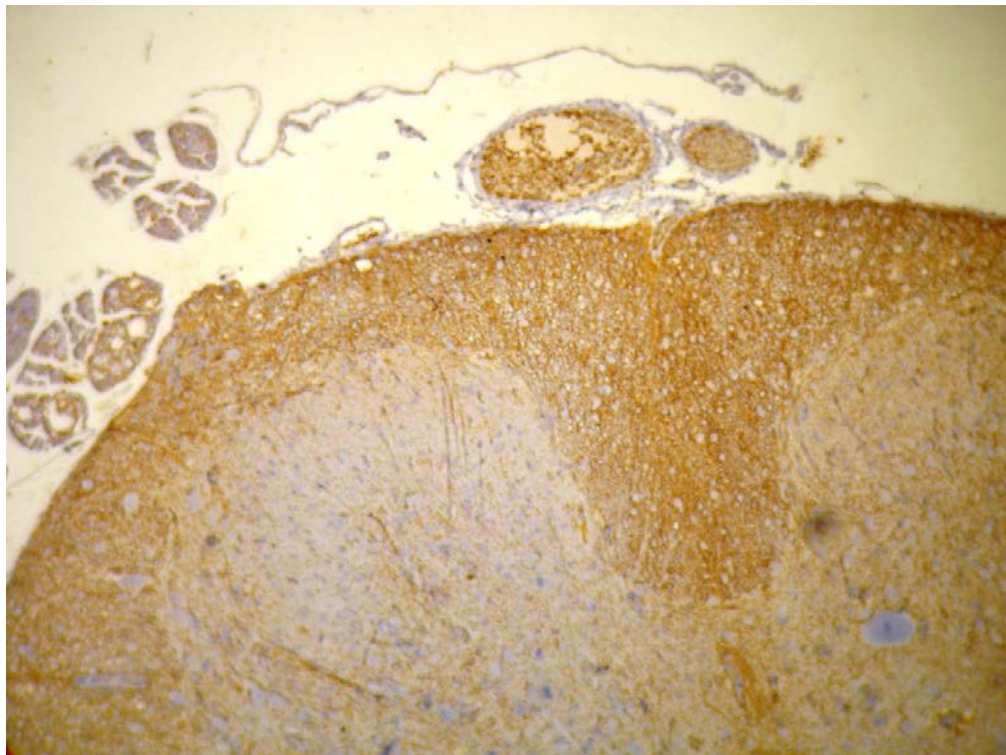
**Figura 4** - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais. HE 40x. Grupo 1.



**Figura 5** - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais. HE 100x. Grupo 1.



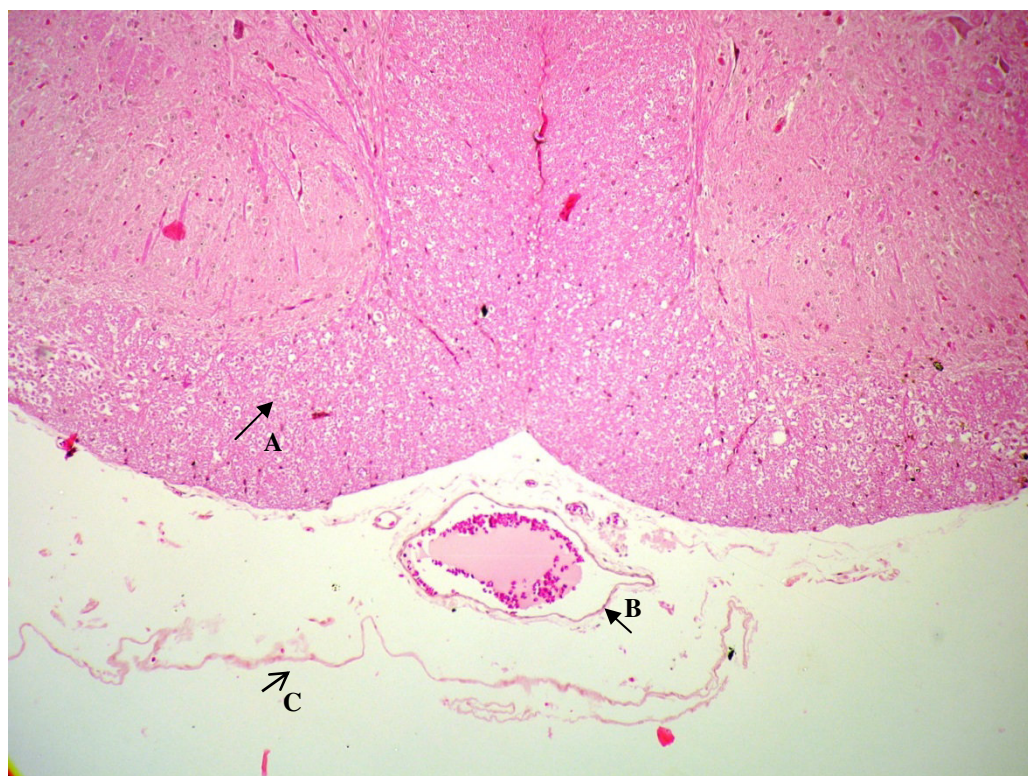
**Figura 6** - Tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges normais. GFAP 40x. Grupo 1.



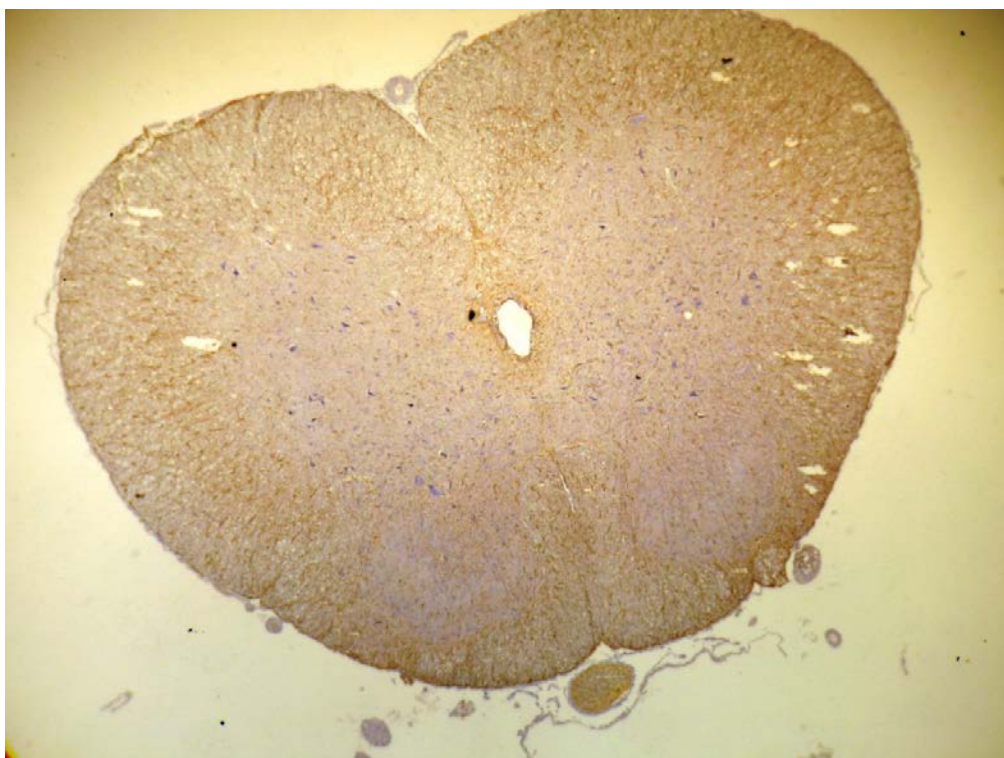
**Figura 7** - Tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges normais. GFAP 100x. Grupo 1.



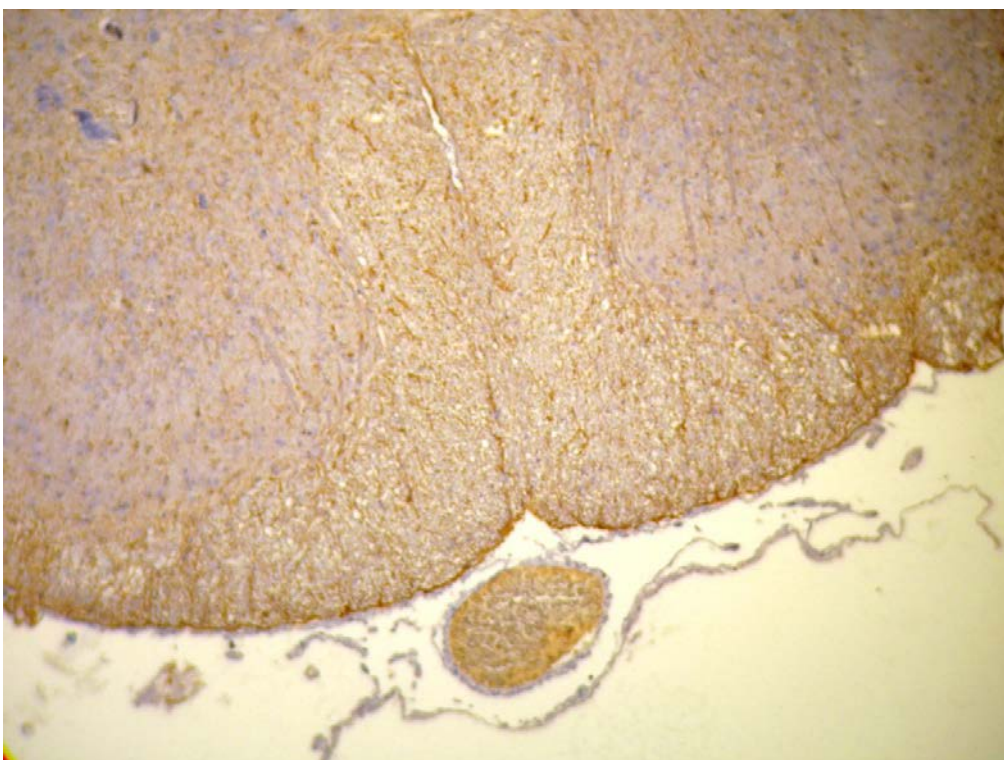
**Figura 8** - Tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges normais. HE 40x. Grupo 2.



**Figura 9** - Tecido nervoso (A), vasos sanguíneos (B) e meninges (C) normais. HE 100x. Grupo 2.



**Figura 10** - Tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges normais. GFAP 40x. Grupo 2.



**Figura 11** - Tecido nervoso, vasos sanguíneos e meninges normais. GFAP 100x. Grupo 2.

## 5 *Discussão*

## 5.1 Discussão da Metodologia

### 5.1.1 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<sup>34,40</sup>, nos quais os fármacos foram administrados no espaço subaracnoideo com punção única, não foram observadas, à microscopia óptica, alterações histológicas do tecido nervoso medular da maioria dos animais que receberam solução fisiológica (doze coelhos). Em apenas um deles foi constatada laceração intensa da medula espinhal no local da punção<sup>40</sup>, que foi realizada entre a última vértebra lombar e a primeira vértebra sacral.

Ready et al.<sup>34</sup> descreveram 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 refluiu através do canhão da agulha. Para diminuir a manipulação da agulha e, conseqüentemente, a possibilidade de trauma do tecido nervoso desencadeado pela punção, o espaço subaracnoideo foi identificado com auxílio de estimulador de nervo periférico.

Estudo anatômico do sistema nervoso central do coelho (*Oryctolagus cuniculus*) mostra que o comprimento do cone medular pode estender-se da segunda à quarta vértebra sacral<sup>55</sup>.

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 injetada<sup>56</sup>.

Assim sendo, na presente pesquisa, a utilização do ultrassom como guia de punção permitiu a visibilização 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 determinou possíveis alterações no tecido nervoso da medula e nas meninges.

### **5.1.2 Grupos experimentais**

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

Como o espaço subaracnoideo do coelho, no local onde foi realizada a punção, que é o mais caudal que permite a passagem da agulha, é pequeno, visto que ainda contém o tecido medular<sup>55</sup>, era imperativo que o volume da solução administrada não

fosse o fator desencadeador de lesões nervosas. Alguns autores aventaram a hipótese de que aumentos agudos no volume do liquor poderiam levar ao aumento na pressão líquórica, comprometer o fluxo sanguíneo medular e causar isquemia medular com o surgimento de lesões neurológicas<sup>57</sup>. Somando-se ao que já foi descrito, este grupo serviu, também, para excluir eventual injeção intraneural da solução. Está descrito, na literatura, que a injeção de solução salina, em volume de 0,05 ml, no interior dos fascículos de nervos periféricos de coelhos foi suficiente para degenerar os axônios<sup>58,59</sup>.

Já o grupo 2, que recebeu a cetamina S (+) a 5%, sem conservantes, teve por objetivo avaliar os efeitos que o fármaco determinaria sobre o tecido nervoso.

### **5.1.3 GFAP**

A ativação glial é muito estudada em decorrência de seu papel na lesão e reparação do sistema nervoso central (SNC). Há muito se reconhece que a resposta microglial a quase todas as formas de lesão do SNC pode ser considerada como um dos primeiros indicadores da doença latente. A ativação microglial envolve um padrão estereotipado de respostas celulares que incluem proliferação, recrutamento no local da lesão e aumento da expressão de imunomoléculas<sup>60</sup>. Os astrócitos estão entre as primeiras células que respondem à lesão do SNC. A hipertrofia e, em menor extensão, a proliferação de astrócitos são as primeiras respostas observadas. Os astrócitos aumentam de tamanho porque contêm grandes quantidades de organelas citoplasmáticas e, em particular, grandes quantidades de GFAP<sup>61</sup>.

Existem evidências de que a microglia pode contribuir diretamente para exacerbar a degeneração neuronal<sup>62,63</sup>. Assim sendo, o GFAP serviu de marcador precoce da lesão neural<sup>45</sup>.

#### **5.1.4 Tempo de observação clínica no cativo**

O tempo de observação clínica prolongada (21 dias) teve por objetivo avaliar os efeitos crônicos que a cetamina S (+) 5%, sem conservantes, poderia desencadear também sobre as meninges, visto que resultados de pesquisas anteriores, realizadas em cães, demonstraram que, quando o fármaco agride primariamente o tecido nervoso, as alterações clínicas e histológicas são detectadas imediatamente após a administração do agente<sup>54,64,65</sup> porém, para detecção de lesões nas meninges, é necessário tempo maior para que a inflamação e a aderência entre as meninges ocorram<sup>66-68</sup>.

## **5.2 Discussão dos resultados**

Como não foram observadas, em qualquer dos animais incluídos no estudo, quaisquer alterações de sensibilidade dolorosa e de força muscular durante o período de cativo; como nos animais pertencentes ao grupo controle, nos quais foi administrada solução fisiológica pela via subaracnoidea, não foram observadas alterações histológicas na medula espinhal e nas meninges à microscopia óptica; como os resultados histológicos referentes aos cortes do tecido nervoso e das meninges dos animais que receberam cetamina S (+) a 5%, sem conservantes também não mostraram alterações e também não foram detectadas diferenças, entre os grupos, na quantidade de GFAP citoplasmático contida nos astrócitos, estes resultados são diferentes daqueles observados, também em coelhos, nos quais a cetamina S(+), sem conservantes (nas concentrações de 0,5 e 1%), em doses de 0,7 mg. kg<sup>-1</sup>, em injeções repetidas, causou alterações histológicas extensas na substância cinzenta (cromatólise do nervo motor), em torno do canal central (perda endoepidural e subependimária) e na região subpial (perda de mielina, edema de axônio, necrose e leucodiarreia reativa)<sup>30</sup>. A diferença pode ser

explicada pelo fato de que, na pesquisa de Vranken et al.<sup>30</sup> as doses foram repetidas e no presente estudo foi administrada uma única dose.

Contudo, até mesmo injeções repetidas podem não causar lesões histológicas exuberantes, dependendo da espécie estudada. Assim, Errando et al.<sup>69</sup> estudaram em suínos os efeitos determinados pela cetamina racêmica a 5%, sem conservantes, e observaram discreta perda neural (inferior a 5%) no corno posterior da medula espinal após administração subaracnóidea diária de  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  durante sete dias. Os animais foram sacrificados após 35 dias de cativeiro e não foi estudada a histologia das meninges<sup>69</sup>.

É descrito que doses repetidas de cetamina S (+) podem determinar antagonismo excessivo no receptor do NMDA. Este antagonismo pode produzir neurotoxicidade devido à inativação do mecanismo inibitório (envolvendo bloqueio do receptor do NMDA no interneurônio, mediado pelo ácido  $\gamma$ -aminobutírico que é responsável pela inibição tônica das vias excitatórias), resultando em lesão excitotóxica com necrose celular e apoptose<sup>70</sup>. Além disso, o prolongado antagonismo do receptor NMDA impede os mecanismos endógenos de sobrevivência e regeneração dos neurônios<sup>71</sup>.

Com relação à cetamina S (+), sem conservantes, estudo em cães que receberam, pela via subaracnoidea, a dose de  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  em concentrações que variaram de 0,6% a 1,5%, não foram encontradas quaisquer alterações histológicas à microscopia óptica no tecido nervoso medular e nas meninges após 21 dias de cativeiro<sup>31</sup>. Porém, outros autores utilizando metodologia semelhante, também em cães, obtiveram resultados diferentes<sup>72</sup>. Após a injeção subaracnoidea de cetamina S(+), sem conservantes em doses menores que o estudo citado anteriormente ( $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  e  $0,7$

mg.kg<sup>-1</sup>) relataram gliose, edema axonal, cromatólise central, infiltração linfocítica, degeneração axonal, vasculite e espessamento de dura-máter. Eles descreveram a ocorrência de punção traumática em cinco cães, não explicitando a qual grupo pertenciam os animais em questão e qual foi a porcentagem do campo histológico comprometida pela lesão do tecido nervo e das meninges.

Nos últimos anos, foi publicado na literatura trabalho experimental realizado em ratos, nos quais foi provocada a isquemia da medula espinal, que mostrou que o emprego da cetamina S (+) pela via subaracnoidea foi benéfica na neuroproteção sugerindo que poderia ser possível a utilização do fármaco, associada aos corticosteroides, em situações análogas à acima descrita<sup>73</sup>.

Apesar dos resultados da presente pesquisa sugerirem que a administração de dose única de cetamina S (+) sem conservante no espaço subaracnoideo de coelhos não desencadeiem lesões no tecido nervoso medular e nas meninges, ainda não há consenso sobre este tema. Portanto, novos estudos se fazem necessários para elucidar esta questão.

## 6 *Conclusão*

Neste modelo experimental em coelhos, cetamina S (+) a 5%, sem conservantes, administrada no espaço subaracnoideo em dose única, não desencadeou alterações histológicas sobre o tecido nervoso e as meninges.

## *7 Referências*

1. Menezes MS. Anatomia e fisiopatologia da dor. In: Anestesiologia: princípios e técnicas. Porto Alegre: Artemed. 2004. p 1251-57.
2. Besson P, Perl ER. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol*, 1969; 32: 1025-43.
3. Loewenstein WR. Mechano-Electric Transduction in the Pacinian Corpuscle: Initiation of Sensory Impulses in Mechanoreceptors. In: Autrum H. *Handbook of Sensory Physiology*. Berlin: Springer-Verlag. 1971. p 267-90.
4. Levine JD, Taiwo Y. Inflammatory Pain, em: Wall PD, Melzack R, Bonica JJ. *Textbook of Pain*. 3<sup>rd</sup> ed., Edinburg: Churchill Livingstone. 1994. p 45-56.
5. Bedbrook GM. Injuries of the Thoracolumbar Spine with Neurological Symptoms. In: Vinken PJ, Bruyn GW. *Handbook of Clinical Neurology*. 25<sup>th</sup> ed. Amsterdam. North-Holland. 1976. p 437-66.
6. Piotrowski W, Foreman JC. Some effects of calcitonin gene-related peptide in human skin and on histamine release. *Br J Dermatol*, 1986; 114: 37-46.
7. O'Banion MK. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, 1999; 13: 45-82.
8. Webster KE. Somaesthetic pathways. *Br Med Bull*; 1977; 33: 113-20.
9. Woolf CJ. Somatic pain – pathogenesis and prevention. *Br J Anaesth*, 1995; 75: 169-76.
10. Dickenson AH. Recent advances in the physiology and pharmacology of pain: plasticity and its implications for clinical analgesia. *J Psychopham*, 1991; 5: 342-51.
- 11.Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res*, 1990; 535: 155-8.

12. Malmberg AB, Yaksh TL. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science*, 1992; 257: 1276-9.
13. Kohrs R, Durieux ME. Ketamina: teaching an old drug new trick. *Anesth Analg*, 1998; 87:1186-93.
14. Dahl V, Raeder J C. Non-opioid postoperative analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2000; 44:1191-203.
15. Reich DL, Silvay G. Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can J Anaesth*, 1989; 36: 186-97.
16. Ravat F, Dorne R, Baechle JP et al. Epidural Ketamine or morphine for postoperative analgesia. *Anesthesiology*, 1987; 66: 819-22.
17. Walker SM, Goudas LC, Cousins MJ, Car DB. Combination spinal analgesic chemotherapy: A systemic review. *Anesth Analg*, 2002; 95: 674-715.
18. Hocking G, Cousins MJ. Ketamine in chronic pain: an evidence-based review. *Anesth Analg*, 2003; 97: 1730-9.
19. Benrath J, Scharbert G, Gustorff B, Adams HA, Kress HG. Long-term intrathecal S (+)-ketamine in a patient with cancer-related neuropathic pain. *Br J Anaesth*, 2005; 95: 247-9.
20. Unlugenc H, Ozalevli M, Gunes Y, Olugner S, Evrüke C, Ozcenagiz D, et al. A double-blind comparison of intrathecal S (+) ketamine and fentanyl combined with bupivacaine 0,5% for caesarean delivery. *Eur J Anaesthesiol*, 2006; 23: 1018-24
21. Bell RF, Dahl JB, Moore RA, Kalso E. Peri-operative ketamine for acute post-operative pain: a quantitative and qualitative systematic review (Cochrane review). *Acta Anaesthesiol Scand*, 2005; 49:1405–28.

22. Klimscha W, Horvath G, Szikszay M, Dobos I, Benedek G. Antinociceptive effect of the S (+) enantiomer of ketamine on carrageenan hyperalgesia after intrathecal administration in rats. *Anesth Analg*, 1998; 86: 561-5.
23. Tugal T, Demirbilek S, Koroglu A, Yapici E, Ersoy O. Effects of S (+) ketamine added to bupivacaine for spinal anaesthesia for prostate surgery in elderly patients. *Eur J Anaesthesiol*, 2004; 21: 193-7.
24. Yanli Y, Eren A. The effects of extradural ketamine on onset time and sensory block in extradural anaesthesia with bupivacaine. *Anaesthesia*, 1996; 51: 84-6.
25. Weir PS, Fee JP. Double-blind comparison of extradural block with three bupivacaine-ketamine mixtures in knee arthroplasty. *Br J Anaesth*, 1998; 80: 299-301.
26. Karpinski N, Dunn J, Hansen L, Masliah E. Subpial vacuolar myelopathy after intrathecal ketamine: report of a case. *Pain*, 1997; 73: 103-5.
27. Brock-Utne JG, Mankowitz E, Lallichurum S. Effects of intrathecal saline and ketamine with and without preservative on the spinal roots of monkeys. *S Afr Med J*, 1982; 61: 360-1
28. Malinovsky JM, Cozian A, Lepage JY, Mussini J, Pinaudt M, Souron R. Ketamine and midazolam neurotoxicity in the rabbit. *Anesthesiology*, 1991; 75: 91-7.
29. Borgbjerg FM, Svensson BA, Frigast C, Gordh Jr T. Histopathology after repeated intrathecal injections of preservative-free ketamine in rabbits: a light and electron microscopic examination. *Anesth Analg*, 1994; 79: 105-11.
30. Vranken JH, Troost D, Haan P, Pennings FA, Vegt MH, Dijkgraaf MGW, Hollmann MW. Severe toxic damage to the rabbit spinal cord after intrathecal administration of preservative-free S (+)-ketamine. *Anesthesiology*, 2006; 105:813-818.

31. Rojas AC, Alves JG, Lima, RM, Marques MEA, Barros GAM, Fukushima FB, Ganem EM. The effects of subarachnoid administration of preservative-free S(+)-ketamine on spinal cord and meninges in dogs. *Anesth Analg*, 2012; 114: 450–5.
32. Myers RR, Sommer C. Methodology for spinal neurotoxicity studies. *Reg Anesth*, 1993;18: 439-47.
33. Sabbe MB, Grafe MR, Pfeifer BL. Toxicology of baclofen continuously infused into the spinal intrathecal space o the dogs. *Nerotoxicology*, 1993; 14:397-410.
34. Ready LB, Plumer MH, Haschke RH et al - Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology*, 1985;63: 364-370.
35. Malinovsky JM, Charles F, Baudrimont M, péréon Y, Corre PL, Pinaud M, Benhamou D. Intrathecal ropivacaine in rabbits: Pharmacodynamic and neurotoxicologic study. *Anesthesiology*, 2002; 97:429-435.
36. Yamashita A, Matsumoto M, Matsumoto S, Itoh M, Kawai K, Sakabe T. A comparison of the neurotoxic effects on the spinal cord of tetracaine, lidocaine, bupivacaine and ropivacane administered intrathecally in rabbits. *Anesth Analg*, 2003; 97:512-519.
37. Oka S, Matsumoto M, Ohtake K, Kiyoshima T, Nakakimura K, Sakabe T. The addition of epinephrine to tetracaine injected intrathecally sustains an increase in glutamate concentrations in the cerebrospinal fluid and worsens neuronal injury. *Anesth Analg*, 2001; 93:1050-1057.
38. Kaneko S, Matsumoto M, Tsuruta S, Hirata T, Gondo T, Sakabe T. The nerve root entry zone is highly vulnerable to intrathecal tetracaine in rabbits. *Anesth Analg*, 2005; 101: 107-114.
39. Wang BC, Hillman DE, Spielholz NI, Turndorf H. Chronic neurological deficits and nesacaine-CE – An effect of the anesthetic, 2-chloroprocaine, or antioxidant, sodium bisulfite? *Anesth Analg*, 1984: 63: 445-457.

40. Adams HJ, Mastro AR, Eicholzer AW, Kilpatrick G. Morphologic effects of intrathecal etidocaine and tetracaine on the rabbit spinal cord. *Anesth Analg*, 1974; 53:904-908.
41. Wakamatsu H, Matsumoto M, Nakakimura K, Sakabe T. The effects of moderate hypothermia and intrathecal tetracaine on glutamate concentrations of intrathecal dialysate and neurologic and histopathologic outcome in transient spinal cord ischemia in rabbits. *Anesth Analg*, 1999; 88:56-62.
42. Hashimoto K, Karasawa F, Sayoh T. Intrathecal midazolam attenuates renal sympathetic nerve activity in rabbits. *Masui*, 1997; 46:1059-1065.
43. Demerel E, Ugur HC, Dolgun H, Kahilogulari G, Sargon ME, Egemen N, Kecik Y. The neurotoxic effects of intrathecal midazolam and neostigmine in rabbits. *Anaesth Inten Care*, 2006; 34:218-223.
44. Saeki H, Matsumoto M, Kaneko S, Tsuruta S, Cui YJ, Ohtake K, Ishida K, Sakabe T. Is intrathecal magnesium sulfate safe and protective against ischemic spinal cord injury in rabbits? *Anesth Analg*, 2004; 99:1805-1812.
45. DeLeo JA, Colburn RW, Rickman AJ, Yeager MP. Intrathecal catheterization alone induces neuroimmune activation in the rat. *Eur J Anaesthesiol*, 1997; 1:115-122.
46. Long JB, Mobley WC, Holaday JW. Neurological dysfunction after intrathecal injection of Dynorphin A (1-13) in rat. 1. Injection producers modify pharmacological responses. *J Pharmacol Exp Ther*, 1988; 246:1158-1166.
47. Dirksen R, Lerou J, Nijhuis GMM, Booij LHDJ, Jurna I. Intrathecal somatostatin produces effects dependent on the interval between catheter implantation and drug injection. *Life Sci*, 1990; 47:1347-1354.
48. Madsen JB, Molke JF, Faber T, Bille-Hansen V. Chronic catheterization of epidural space in rabbits; a model for behavioural and histopathological studies. Examination of meptazinol neurotoxicity. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1993; 37:307-313.

49. Grip G, Svensson BA, Gordth Jr T et al. Histopathology and evaluation of potentiation of morphine-induced antinociception by intrathecal droperidol in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1992; 36:145-152.
50. Drummond JC, Moore SS. The influence of dextrose administration on neurological outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology*, 1989;70:64-70.
51. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*, 2001; 23:291-9.
52. Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 2004; 11:36-42.
53. Colour Deconvolution. Landini G, 2010. (Accessed 11/11, 2011, at <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>).
54. Okagawa SR, Ganem EM, Marques AME, Castiglia YMM. Efeitos de concentrações crescentes de lidocaína hiperbárica, administradas no espaço subaracnóideo, sobre a medula espinhal e as meninges. Estudo experimental no cão. *Rev Bras Anesthesiol*, 2006; 56:253-62
55. D Santos ALQ, Lima EMM, Santana MIS. Length of spinal cord and topography of medular cone in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Bioscience Journal*, 1999;15:45-62
56. Ting PH, Antonakakis JG. Evidence-based review of ultrasound imaging for regional anesthesia. *Semin Anesth*, 2007; 26: 218-28.
57. E. Rosen MA, Baysinger CL, Shnider SM et al. Evaluation of neurotoxicity after subarachnoid injection of large volumes of local anesthetic solutions. *Anesth Analg*, 1983; 62:802-8.
58. 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<sup>R</sup>). *Acta Anaesth Scand*, 1979;23:127-36.
59. Rice AS, McMahon SB. Peripheral nerve injury caused by injection needles used in regional anaesthesia: influence of bevel configuration, studied in a rat model. *Br J Anaesthesiol*, 1992; 69:433-8.
  60. Moore S, Thanos S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol*, 1996; 48:441-60.
  61. O'Callaghan JP, Miller D. Nervous system-specific proteins as biochemical indicators of neurotoxicity. *Trends Pharmacol Sci*, 1983; 4:388-390.
  62. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia*, 1993; 7:111-118.
  63. Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci*, 1996; 19:331-338.
  64. Ganem EM, Vianna PT, Marques M, Castiglia YM, Vane LA. Neurotoxicity of subarachnoid hyperbaric bupivacaine in dogs. *Reg Anesth*, 1996; 21: 234-8.
  65. Ganem EM, Vianna PT, Marques M, Castiglia YM, 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 Anesthesiol*, 2003; 53: 351-60.
  66. Barros GAM, Marques MEA, Ganem EM. The effects of intrathecal administration of betamethasone over dogs spinal cord and meninges. *Acta Cir Bras*, 2007; 22; 361-5
  67. Fukushima FB; Barros GAM, Marques MEA, Vidal EIO, Ganem EMG. The neuraxial effects of intraspinal amitriptyline at low concentrations. *Anesth Analg*, 2009; 109:965-71

68. Lima RM, Navarro LH, Carness JM, Barros GA, Marques MEA, Solanki D, Ganem EM. Clinical and histological effects of the intrathecal administration of methylprednisolone in dogs. *Pain Physician*, 2010; 13:493-501.
69. Errando CL, Sifre C, Moliner S, Valía JC, Gimeno O, Mínguez A, Boils P. Subarachnoid ketamine in swine-pathological findings after repeated doses: acute toxicity study. *Reg Anesth Pain Med*, 1999; 24:146–52.
70. Farber NB, Kim SH, Dikranian K, Jiang XP, Heinkel C. Receptor mechanisms and circuitry underlying NMDA antagonist neurotoxicity. *Mol Psychiatry*, 2002;7:32-43.
71. Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD. The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. *Curr Mol Med*, 2004;4:131-6.
72. Gomes LMRS, Garcia JBSG, Ribamar JS, Nascimento AGP. Neurotoxicity of subaracnoid preservative-free S (+) Ketamine in dogs. *Pain Physician*, 2011; 14:83-90.
73. Kose EA, Bakar B, Ayva SK, Kilinc K, Apan A. , Neuroprotective effects of racemic ketamine and (S)-ketamine on spinal cord injury in rat. *Injury*. 2012 Jul;43(7):1124-30.