

**Ivan Dias Fernandes Pereira**

**Modelo experimental para estudo de toxicidade do tecido nervoso e de meninges em coelhos utilizando ultrassom para orientar a punção subaracnoidea**

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 Laís Helena Navarro e Lima**

**Botucatu – SP**  
**2015**

*“Se, na verdade, a justiça é sabedoria e virtude, julgo que facilmente se demonstrará que é mais forte do que a injustiça, uma vez que a injustiça é ignorância”*

**Platão**

## *Dedicatórias*

---

**À minha Família,**

que me acompanha em todos os momentos, dedico este capítulo da minha vida.

*“A família é uma das obras-primas da natureza.”*

**George Santayana**

Dedico este trabalho

À minha esposa, **Márcia**, minha amada, que me dá suporte e sempre me ensina a ser uma pessoa melhor.

Aos meus filhos, **Lorena e João Henrique**, que são a razão da minha existência.

*“O amor da família e a admiração dos amigos são muito mais importantes do que a riqueza e os privilégios.”*

**Charles Kuralt**

Também dedico esta Tese

Aos meus pais, **Carmen e Luiz Carlos** (*in memoriam*), por dedicarem-se a mim com amor e carinho em todos os momentos da minha vida.

Aos meus sogros, **Balbina e Rafael**, que sempre me incentivaram e se dispuseram a ajudar.

## *Agradecimientos*

---

## **Agradecimento Especial**

**À Prof<sup>a</sup> Titular Eliana Marisa Ganem,**

pela orientação, dedicação, objetividade, paciência e disposição para ensinar o caminho em todos os momentos desta Tese.

*“Se não fosse imperador, desejaria ser professor. Não conheço missão maior e mais nobre que a de dirigir as inteligências jovens e preparar os homens do futuro”*

**D.Pedro II**



## **Agradecimentos**

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Laís Helena Navarro de Lima**, coorientadora, pela preciosa ajuda na elaboração desta Tese.

Aos **Docentes do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP**, pela preocupação em proporcionar a base da minha formação como especialista.

À Prof<sup>a</sup> Titular **Yara Marcondes Machado Castiglia**, por sempre ter conseguido transmitir os valores morais e profissionais aos seus residentes.

Ao Dr. **Felipe Gilberto Valerini**, que participou na aquisição dos dados desta pesquisa no laboratório experimental, como aluno de graduação, com bolsa de iniciação científica.

À Prof<sup>a</sup> **Mariângela Esther Marques**, Livre docente do Departamento de Patologia da FMB-UNESP, pelo exame histológico.

Ao Prof. Dr. **Hélio Miot**, do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-UNESP, pela análise imuno-histoquímica.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Vânia M. V. Machado**, do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP, pelo auxílio com a ultrassonografia.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Lídia Raquel de Carvalho**, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, pela análise estatística dos resultados desta pesquisa.

À Sra. **Joana Jacirene Costa Teixeira**, secretária do Departamento de Anestesiologia, pelo apoio e trabalho gráfico.

À Sra. **Sônia Maria Martins da Silva**, pelo apoio na secretaria do Departamento de Anestesiologia.

Ao Sr. **André Renato Passaroni**, pelo auxílio no serviço de computação.

À Sra. **Neli Aparecida Pavan**, pelo apoio e dedicação em todos os assuntos relacionados à pós-graduação.

À Sra. **Tatiane de F. Pineiz Biondo**, pelo apoio.

Aos **amigos anesthesiologistas do SMA Ltda**, pelo apoio.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP**, pelo auxílio financeiro (**Processos 2009/54490-3 e 2009/54408/5**).

*“Presta o ouvido a todos, e a poucos a voz. Ouve as censuras dos demais; mas reserva tua própria opinião”*

**William Shakespeare**

*Resumo / Abstract*

---

Pereira IDF. Modelo experimental para estudo de toxicidade do tecido nervoso e de meninges em coelhos utilizando ultrassom para orientar a punção subaracnóidea. Botucatu, 2015. 72p. Tese (Doutorado em Anestesiologia), Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

## RESUMO

**Justificativa:** complicações neurológicas após bloqueios do neuroeixo são raras, porém quando ocorrem são potencialmente devastadoras. Muitos animais são utilizados para o estudo de toxicidade do tecido nervoso e das meninges. O coelho tem sido empregado em diversas pesquisas sobre neurotoxicidade, porém, na maioria delas, o fármaco foi introduzido no espaço subaracnoideo por meio de cateter, implantado de forma crônica. Esta técnica não reproduz aquela utilizada na clínica anestésica, o que pode comprometer a avaliação dos resultados. Como a punção no coelho é realizada onde ainda existe tecido nervoso medular, a utilização do ultrassom como guia de punção pode evitar o trauma desencadeado pela agulha da punção e injeção da solução no interior do tecido medular.

**Objetivos:** avaliar o modelo de estudo de toxicidade de tecido nervoso e de meninges utilizando-se o ultrassom para orientar a introdução da agulha no espaço subaracnoideo de coelhos, com a finalidade de evitar as lesões desencadeadas pelo trauma de punção e pela injeção intraneural de soluções.

**Metodologia:** foram utilizados 45 coelhos adultos jovens, fêmeas, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 3200 e 4400 gramas e comprimentos de medula espinal entre 34 e 38 cm, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os animais foram divididos em 3 grupos (G): G1 punção subaracnoidea, G2 solução fisiológica 0,9% e G3 bupivacaína hiperbárica 0,5%. Após anestesia venosa com xilazina e cetamina, foi realizada a abordagem do espaço subaracnoideo (agulha de Quincke 22G 1½”) no espaço intervertebral entre a primeira e a segunda vértebra sacral, guiada por ultrassom. Os animais de G2 e G3 receberam as soluções correspondentes em volume de 5 µL por centímetro de medula espinal (0,2 mL) e os de G1 somente a punção subaracnoidea. Os animais foram avaliados clinicamente, quanto à sensibilidade e motricidade, durante 3 dias. Após este período de avaliação, foram sacrificados por decapitação, sob anestesia com pentobarbital sódico, e retiradas as porções lombar e sacral da medula espinal para exame histológico por microscopia óptica e imuno-histoquímica (marcador celular para proteína glial fibrilar ácida-GFAP). Para comparação dos grupos foram utilizados a análise de variância-ANOVA (peso, comprimento de medula espinal e volume injetado) e o teste não paramétrico de Mann-Whitney (GFAP), com  $p < 0,05$ .

**Resultados:** apenas um animal (G2), dos 45 estudados, apresentou infiltrado inflamatório linfocitário com necrose de substância cinzenta (área  $< 1\%$ ) e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular em meninges, em local distante da punção. Todos os animais recuperaram a motricidade e sensibilidade. A marcação celular para GFAP não diferiu entre os grupos estudados.

**Conclusão:** ultrassom é método útil e seguro para a correta identificação do espaço subaracnoideo de coelhos e estudo da neurotoxicidade.

**Palavras-chave:** neurotoxicidade, anestesia subaracnoidea, ultrassom, coelhos

Pereira IDF. Experimental model to study toxicity of nerve tissue and meninges in rabbits using ultrasound to guide the subarachnoid puncture. Botucatu, 2015. 72p. Thesis (PhD in Anesthesiology). Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

## ABSTRACT

**Background:** neurological complications after spinal blockade are rare, but when they do occur are potentially devastating. Many animals are used for the study of toxicity of the nervous tissue and meninges. The rabbit has been employed in several studies on neurotoxicity, however, in most of them, the drug was introduced in the subarachnoid space through a catheter implanted chronically. This technique does not reproduce the one used in clinical anesthesia, and therefore can compromise the evaluation of the results. As the puncture of the rabbit is performed where there is still spinal cord, the use of ultrasound as a guide of puncture can avoid the trauma triggered by needle puncture and injection of the solution inside the medullary tissue.

**Objectives:** To evaluate the model for study of toxicity of nervous tissue and meninges using ultrasound to guide the introduction of the needle in the subarachnoid space of rabbits, with the purpose to avoid the injury triggered by the trauma of puncture and by intraneural injection of solutions.

**Methodology:** Forty-five young adult female rabbits were used, from the "Genetic Group of Botucatu" race, with weights between 3200 and 4400 g and lengths of spinal cord between 34 and 38 cm, supplied by the animal facility of the Botucatu Medical School. The animals were divided into 3 groups (G): G1 subarachnoid puncture, G2 saline solution 0.9% and G3 hyperbaric bupivacaine 0.5%. After intravenous anesthesia with xylazine and ketamine, was performed the approach to the subarachnoid space (Quincke needle 22G 1½") in the intervertebral space between the first and second sacral vertebra, guided by ultrasound. The animals of G2 and G3 received the corresponding solutions in volume of 5µL per centimeter of spinal cord (0.2 mL) and the G1 only the subarachnoid puncture. The sensitivity and motility of the animals were evaluated during 3 days. After this trial period, the animals were sacrificed by decapitation, under anesthesia with sodium pentobarbital, and removed the lumbar and sacral portions of the spinal cord for histological examination by optical microscopy and immunohistochemistry (cellular marker for glial fibrillary acidic protein-GFAP). For the comparison of the groups were used the analysis of variance-ANOVA (weight, length of the spinal cord and injected volume) and the non-parametric Mann-Whitney test (GFAP), with  $p < 0.05$ .

**Results:** only one animal (G2), of the 45 studied, presented lymphohistiocytic inflammatory infiltrate with necrosis of gray substance (area  $< 1\%$ ) and perivascular lymphocytic inflammatory infiltrate in meninges, in distant location of the puncture. All animals recovered motility and sensitivity. The cellular marker quantification for GFAP did not differ between studied groups.

**Conclusion:** ultrasound is safe and effective method for the correct identification of the subarachnoid space of rabbits and study of neurotoxicity.

**Keywords:** neurotoxicity, subarachnoid anesthesia, ultrasound, rabbits.

*Listas de Figuras / Tabelas / Sumário*

---

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática da punção subaracnoidea no interespaço S1-S2.....	33
<b>Figura 2</b>	Sonograma em plano sagital utilizando-se transdutor micro-convexo 6-13 MHz representando o procedimento de punção guiada por ultrassom. A agulha foi inserida no espaço articular entre S1-S2(a), as vértebras sacrais S1-S2 apresentam hiperecogenicidade(b) e o espaço subaracnoideo apresenta característica hipocogênica(c).....	33
<b>Figura 3</b>	Segmento da região posterior da medula espinal. GFAP 200x. Exemplo de área utilizada para estimar o percentual de células marcadas.....	40
<b>Figura 4</b>	A. Área selecionada do tecido neural. B. Área binarizada após o processamento da imagem, resultando em 45% do tecido marcado.....	40
<b>Figura 5</b>	Box Plot da mediana, 1º e 3º quartis do percentual das células do tecido nervoso marcadas pela GFAP nos grupos estudados.....	45
<b>Figura 6</b>	Tecido nervoso (A), vasos (B) e meninges (C) normais. HE 100x.....	47
<b>Figura 7</b>	Tecido nervoso (A) e meninges (B) normais. HE 200x.....	47
<b>Figura 8</b>	Tecido nervoso (A), vasos (B) e meninges (C) normais. GFAP 100x....	48
<b>Figura 9</b>	Tecido nervoso normal (A). GFAP 40x.....	48
<b>Figura 10</b>	Infiltrado linfoplasmocitário perivascular em meninges (A), infiltrado linfo-histiocitário e necrose (B) na substancia cinzenta. HE 40x.....	49
<b>Figura 11</b>	Infiltrado linfoplasmocitário perivascular em meninges (A), infiltrado linfo-histiocitário e necrose (B) na substancia cinzenta. HE 100x.....	49
<b>Figura 12</b>	Infiltrado linfoplasmocitário perivascular em meninges (A), infiltrado linfo-histiocitário e necrose (B) na substancia cinzenta. GFAP 100x....	50
<b>Figura 13</b>	Infiltrado linfo-histiocitário (A) e necrose (B) na substancia cinzenta. GFAP 200x.....	50

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Peso (g), comprimento de medula espinal (cm), volume de solução injetado no espaço subaracnoideo (ml) e porcentagem (%) de tecido marcado pela GFAP. Resultados expressos em média $\pm$ DP.....	45
<b>Tabela 2</b>	Peso (g), comprimento de medula espinal (cm), volume injetado (mL), presença de líquido, dificuldade de visualização do espaço, observação clínica (inicial e nos 3 dias de cativeiro) e resultados histológicos (Hematoxilina-eosina: HE) dos animais pertencentes ao G1.....	51
<b>Tabela 3</b>	Peso (g), comprimento da medula espinal (cm), volume injetado (mL), presença de líquido, dificuldade de visualização do espaço, observação clínica (inicial e nos 3 dias de cativeiro) e resultados histológicos ( Hematoxilina-eosina: HE) dos animais pertencentes ao G2.....	52
<b>Tabela 4</b>	Peso (g), comprimento da medula espinal (cm), volume injetado (ml), presença de líquido, dificuldade de visualização do espaço, observação clínica (inicial e nos 3 dias de cativeiro) e resultados histológicos (Hematoxilina-eosina: HE) dos animais pertencentes ao G3.....	53



## Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVO.....	27
3 MATERIAL E MÉTODO.....	29
3.1 Animais utilizados.....	29
3.2 Grupos experimentais.....	29
3.3 Sequência experimental.....	30
3.4 Técnicas utilizadas.....	31
3.4.1 Preparo do animal.....	31
3.5 Anestesia subaracnoidea.....	31
3.5.1 Técnica de punção.....	31
3.5.2 Volume injetado.....	34
3.5.3 Soluções administradas.....	34
3.5.4 Observação clínica.....	34
3.6 Sacrifício.....	35
3.7 Exame histológico.....	35
3.7.1 Técnica imunohistoquímica para GFAP.....	36
3.8 Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	41
3.9 Modelo de estudo.....	41
3.10 Método estatístico.....	41
4 RESULTADOS.....	44
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÃO.....	62
7 REFERÊNCIAS.....	64

## *1 Introdução*

---

A incidência de complicações neurológicas após bloqueios do neuroeixo é baixa. Estudos publicados na última década mostraram que ela varia de 0,003 a 0,3% após anestesia subaracnoidea e de 0,003 a 0,1% após a técnica peridural<sup>1-3</sup>. Apesar de raras, quando acontecem, podem acarretar efeitos adversos irreversíveis às meninges e ao tecido nervoso da medula espinal e das raízes da cauda equina<sup>4,5</sup>.

Isquemia de medula espinal (secundária à utilização de vasoconstritores e à hipotensão arterial prolongada), lesão traumática da medula espinal e das raízes nervosas durante a inserção da agulha e do cateter, infecções e a própria solução de anestésico local<sup>6-8</sup> contribuem para o aparecimento de eventos neurológicos adversos.

Dentre outras complicações graves, a aracnoidite adesiva crônica (AAC) e a síndrome da cauda equina (SCE) são potencialmente devastadoras.

AAC possui quadro clínico complexo, com variedade de sintomas e de diagnóstico clínico difícil porque os sinais e sintomas não são específicos<sup>9</sup>. As características clínicas mais frequentes são a dor nas costas, que aumenta de intensidade com a atividade, a dor nas pernas, geralmente bilateral, a hiporreflexia, a diminuição da amplitude da movimentação do tronco, as alterações sensitivas, a dificuldade em manter as pernas elevadas e a disfunção do esfíncter urinário. Inicia-se como processo inflamatório da pia-máter 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-máter, a aracnóide e as raízes nervosas, culminando com a aderência entre estas estruturas. Nesta fase o edema das raízes começa a diminuir<sup>10</sup>.

AAC 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 das raízes, levando à atrofia das mesmas e comprometimento dos vasos sanguíneos<sup>10</sup>. Estudos histológicos mostraram vasos sanguíneos com arterite e se discute se esta é a causa ou o resultado da aracnoidite<sup>10</sup>. 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<sup>11</sup>.

Contrastes iodados, corticosteróides administrados no espaço peridural e no subaracnoideo, trauma, sangue, preservativos e conservantes contidos em muitas soluções, contaminantes, como detergentes e até mesmo anestésicos locais<sup>5</sup> foram associados à aracnoidite adesiva. A injeção subaracnoidea de betametasona<sup>12</sup>, metilprednisolona<sup>13</sup> e do antidepressivo amitriptilina<sup>14</sup> desencadeou aracnoidite adesiva em cães.

A síndrome da cauda equina origina-se de alterações na função das raízes que a constituem, ou seja, de L<sub>2</sub> a S<sub>5</sub><sup>15,16</sup>. Caracteriza-se por disfunção vesical e intestinal, graus variáveis de fraqueza muscular nos membros inferiores e perda da sensibilidade em área de períneo (anestesia em sela)<sup>17</sup>. Lesões de S<sub>3</sub>-S<sub>4</sub> causam atonia vesical<sup>16</sup>.

Dentre os fatores potencialmente capazes de desencadeá-la encontram-se o trauma direto ou indireto das raízes, a isquemia, os processos infecciosos e as reações neurotóxicas desencadeadas por fármacos<sup>6</sup>.

Enfoque particular é atribuído aos efeitos neurotóxicos dos anestésicos locais, já descritos na primeira metade do século passado<sup>18-20</sup>, porque a síndrome da cauda eqüina reapareceu em 1991, associada à raquianestesia com a técnica contínua, pela qual se administrou lidocaína a 5% em solução de glicose a 7,5%, por meio de microcateteres<sup>6,21</sup>. Nestes casos, as doses do anestésico local foram mais elevadas do que aquelas usualmente empregadas com injeção única e tiveram por finalidade aumentar a extensão de um bloqueio predominantemente sacral<sup>6</sup>.

A natureza focal do bloqueio pressupôs distribuição não uniforme do anestésico local, que foi injetado por meio de microcateteres. Estes, em decorrência da alta resistência ao fluxo imposto pelo seu pequeno lúmen, propiciaram injeções lentas que comprometeram a dispersão do anestésico local no líquido<sup>22,23</sup>. Quando o fármaco se depositou ao redor das raízes sacrais, houve contato prolongado com o tecido nervoso e aumentou a probabilidade de ocorrer lesão neurológica, que é dependente da concentração<sup>4,8,24</sup>.

Nos últimos anos, foram descritos casos de síndrome de cauda eqüina após administração de grandes volumes de anestésico local, que inicialmente deveriam ser injetados no espaço peridural e, inadvertidamente, foram introduzidos no espaço subaracnoideo<sup>25-27</sup>. Nestes casos, postulou-se que o contato prolongado do anestésico local com o nervo poderia ter contribuído para o aparecimento de déficits neurológicos permanentes<sup>25</sup>.

Em 1999 foram publicados casos de síndrome da cauda eqüina após injeção única da lidocaína hiperbárica a 5%, em doses que não ultrapassaram as recomendadas, sendo que em um destes casos, a lesão neurológica ocorreu após injeção repetida do anestésico local por falha da anestesia<sup>28</sup>. Sabe-se desde 1991, após publicação de

Drasner<sup>29</sup>, que falhas no bloqueio ou bloqueios inadequados podem indicar má distribuição do anestésico local no líquido e que doses repetidas de anestésico local podem resultar em concentrações tóxicas ao tecido nervoso.

Estudos realizados em animais vivos e “in vitro” têm mostrado que a lidocaína e a tetracaína apresentam maior potencial para neurotoxicidade que a bupivacaína<sup>8,30</sup>.

O diagnóstico de SCE é realizado pela história clínica e pela eletroneuromiografia. O quadro clínico é irreversível<sup>31</sup>.

No ano de 1980, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, seis pacientes desenvolveram a SCE após terem sido submetidos à anestesia subaracnoidea com tetracaína que, posteriormente, constatou-se estar em concentração 20% maior do que a preconizada. Em seguida a esses casos clínicos, foi desenvolvido modelo experimental no cão que reproduziu, respeitando-se as diferenças entre as espécies, o quadro observado em seres humanos<sup>4</sup>.

Este modelo experimental propiciou a realização de diversas pesquisas<sup>4,12-14,24,32-35</sup>. Contudo, pela impossibilidade atual de se utilizar cães que não tenham sido criados em cativeiro para experimentos, torna-se necessário encontrar outra espécie animal que permita a realização de pesquisas sobre neurotoxicidade e toxicidade meníngea.

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>7</sup>. O rato, por exemplo, possui o espaço subaracnoideo de tamanho limitado, o que provoca menores diluições e misturas dos fármacos no líquido, 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>36</sup>.

Coelhos são utilizados para o estudo de neurotoxicidade desde o início do século passado<sup>37</sup>. Diversos autores pesquisaram, nesta espécie, os efeitos de anestésicos locais<sup>8,38-44</sup>, dos benzodiazepínicos<sup>45,46</sup>, de anticolinesterásicos<sup>46</sup>, de antagonistas do receptor *N*-metil-D-apartato<sup>47,48</sup>, dentre outras soluções<sup>49</sup>. Na grande maioria destas pesquisas a solução foi introduzida no espaço subaracnoideo por meio de cateter implantado de forma crônica<sup>38-42,45-49</sup> e, em alguns estudos, foram observadas, nos animais do grupo controle, células inflamatórias nas meninges<sup>38,47</sup> e no tecido nervoso<sup>47</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>50</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>51,52</sup>. Somando-se a isto, a cateterização crônica do espaço subaracnoideo e peridural produz alterações histológicas no tecido nervoso medular, em torno do cateter<sup>53,54</sup>. Alguns autores<sup>47</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>55</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.

No cão, submetido à punção subaracnoidea única, não foram observadas alterações histológicas na medula e nas meninges em nenhum animal que recebeu solução fisiológica<sup>12-15</sup>, água destilada<sup>33</sup> ou solução glicosada<sup>24,34</sup>.

Em dois estudos realizados em coelhos<sup>8,43</sup>, nos quais os fármacos foram administrados no espaço subaracnoideo por meio de 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 espinal no local da punção<sup>43</sup>, que foi realizada entre a última vértebra lombar e a primeira vértebra sacral.

A abordagem do espaço subaracnoideo em coelhos foi inicialmente descrita por Bieter et al., em 1936<sup>37</sup>, que utilizaram o espaço lombo-sacral para introdução de soluções. Posteriormente Ready et al.<sup>8</sup> ressaltaram que, no coelho, o espaço subaracnoideo pode ser abordado entre a primeira e a segunda vértebra sacral, pela via paramediana, e que o volume do líquido é pequeno e não reflui 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.

No Laboratório Experimental de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, tentou-se reproduzir a técnica de punção subaracnoidea utilizada por Ready et al.<sup>8</sup>. Após a abordagem do espaço subaracnoideo, ao se perfurar a dura-máter, o animal hiperextendia bruscamente as patas posteriores, causando acidentes de punção. Constatou-se, também, resistência à introdução da solução no espaço subaracnoideo, como se a punção estivesse sendo realizada em local no qual existisse a medula espinal.



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>56</sup>. Após a dissecação da coluna vertebral do animal, que foi realizada no Laboratório Experimental de Anestesiologia, foi constatado que ao nível do espaço intervertebral no qual Ready et al.<sup>8</sup> realizaram a punção raquidiana ainda existe tecido medular e que o espaço subaracnoideo é estreito.

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 melhor visibilidade das estruturas a serem abordadas (nervos), assim como das adjacentes (vasos sanguíneos, pulmão, pleura). Possibilitou, também, o posicionamento adequado da agulha, evitando-se lesão de nervo e injeção intravascular de anestésico local, assim como a observação da área de dispersão da solução injetada<sup>57</sup>.

## *2 Objetivo*

---

Avaliar o modelo de estudo de toxicidade de tecido nervoso e de meninges, utilizando-se o ultrassom para orientar a introdução da agulha no espaço subaracnoideo de coelhos, com a finalidade de evitar as lesões desencadeadas pelo trauma de punção e pela injeção intraneural de soluções.

### *3 Material e Método*

---

### **3.1 Animais utilizados**

Foram utilizados 45 coelhos adultos jovens, fêmeas, da raça Grupo Genético de Botucatu, com pesos entre 3.200 e 4.400 gramas e comprimentos de medula espinal entre 34 e 38 centímetros, fornecidos pelo Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Os critérios de exclusão foram os animais que não apresentaram aspecto sadio, os que necessitaram de mais de uma punção subaracnoidea, bem como aqueles nos quais refluíu sangue pela agulha, o que caracterizou acidente de punção.

Os animais foram randomizados em três grupos experimentais.

### **3.2 Grupos experimentais**

Os animais foram distribuídos por lista gerada por computador e envelopes selados em três grupos experimentais, com 15 animais em cada grupo, submetidos inicialmente à anestesia intravenosa com xilazina e cetamina e, em seguida, à punção subaracnoidea. Os grupos, que se diferenciaram pela presença ou não de solução e pelo tipo de solução administrada, foram divididos da seguinte maneira:

**Grupo 1 (G1)** – Controle de punção – apenas punção subaracnoidea

**Grupo 2 (G2)** – Controle de volume – injeção de solução fisiológica a 0,9%

**Grupo 3 (G3)** – Controle de fármaco – injeção de bupivacaína hiperbárica a 0,5%

### **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 medula espinal
- Limpeza local com água e sabão
- Tricotomia
- Limpeza do local com solução 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
- Punção ou injeção da solução sorteada
- Retirada do animal da mesa
- Observação clínica até recuperação da anestesia
- Manutenção em cativeteiro durante 3 dias sob observação clínica
- Sacrifício do animal
- Remoção da medula espinal 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 a mesa cirúrgica. Para obtenção do comprimento da medula espinal foi medida a distância da base do crânio ao espaço lombo-sacral.
- Foi realizada a limpeza da pele e pelos da região da coluna vertebral com água e sabão, seguida de tricotomia de uma área de 10 cm ao redor do local onde foi realizada a punção, correspondente ao espaço intervertebral S1-S2. Esta região foi lavada com solução fisiológica a 0,9% e, após a antissepsia com solução tópica de gluconato de clorexidina a 2%, foram colocados os campos estéreis.
- Os animais foram posicionados em decúbito ventral com as patas posteriores estendidas sob o abdome.

### 3.5 Anestesia subaracnoidea

#### 3.5.1 Técnica de punção

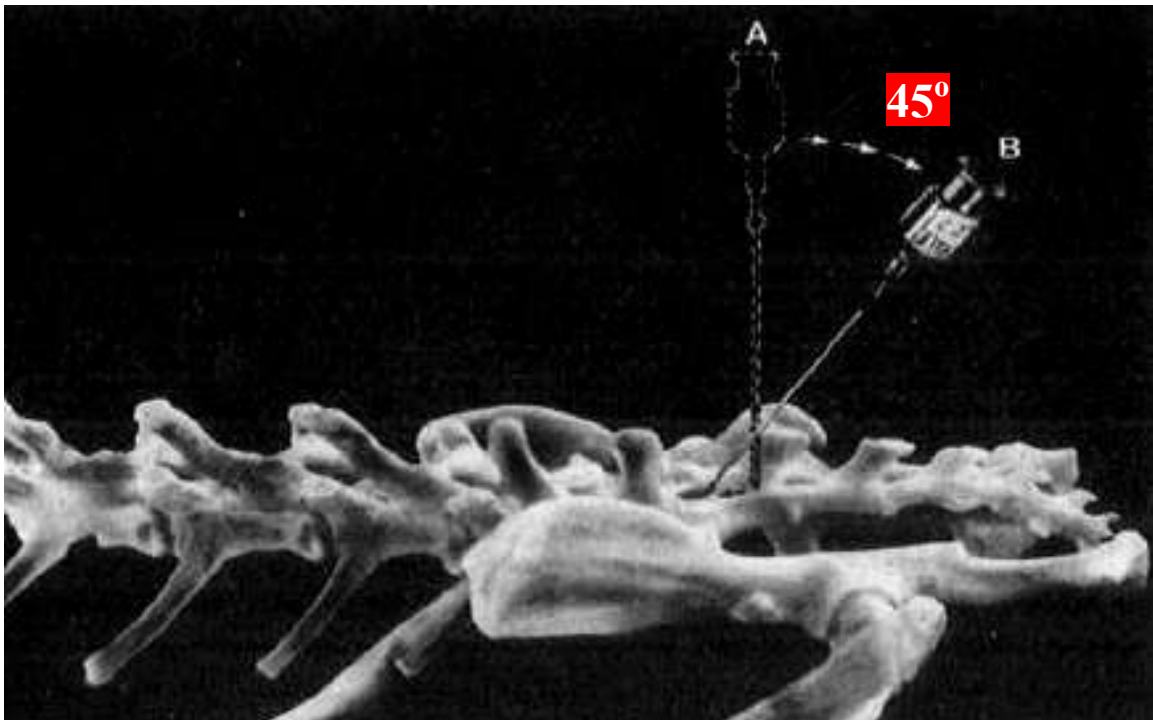
Em modelo experimental de estudo dos efeitos tóxicos de droga administrada no espaço subaracnoideo não pode haver trauma de tecido nervoso desencadeado pela punção. Assim sendo, o espaço intervertebral a ser abordado deve ser o mais caudal que

permita a passagem da agulha, naquela espécie animal. No coelho este espaço encontra-se entre as vértebras S1 e S2. Para a identificação deste espaço 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 a 2 cm em direção caudal. O espaço S1-S2 localiza-se 1 cm caudal ao processo espinhoso da primeira vértebra sacral.

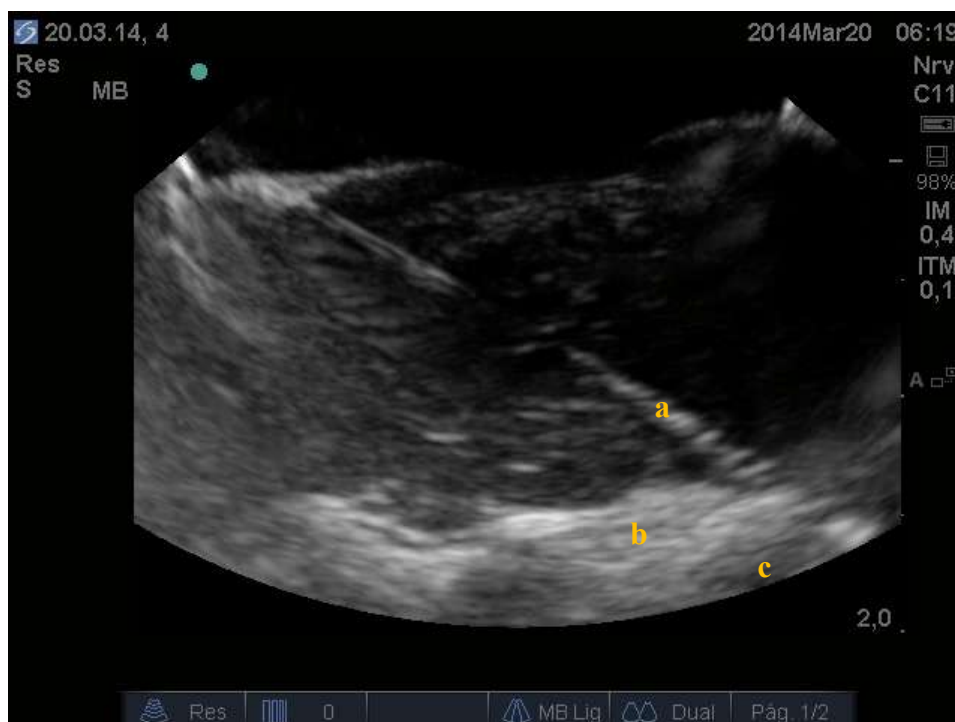
O bloqueio subaracnoideo foi guiado com auxílio da ultrassonografia, utilizando-se o aparelho da marca SonoSite (USA), modelo M-turbo, que possui o recurso de doppler tecidual de parede (TDI). Foi utilizado o transdutor micro-linear com frequência de 6.0 a 13 MHz

A punção subaracnoidea foi realizada com agulha de Quincke de calibre 22G 1½”, por acesso mediano, com ângulo de inclinação de aproximadamente 45°. A agulha foi introduzida lentamente em direção cefálica até penetrar o ligamento amarelo e guiada pelo ultrassom até penetrar o espaço subaracnoideo. Foi retirado o mandril da agulha e observado se havia escoamento de líquido (Figuras 1 e 2).





**Figura 1** - Representação esquemática da punção subaracnoidea no interespaço S1-S2<sup>8</sup>.



**Figura 2** - Sonograma em plano sagital utilizando-se transdutor micro-convexo 6-13 MHz representando o procedimento de punção guiada por ultrassom. A agulha foi inserida no espaço articular entre S1-S2(a), as vértebras sacrais S1-S2 apresentam hiperecogenicidade(b) e o espaço subaracnoideo apresenta característica hipocogênica(c).

Os animais de G1 não receberam nenhuma solução e os de G2 e G3, as soluções correspondentes. Foram registradas as dificuldades na realização da punção e em visibilizar o espaço subaracnoideo, assim como as características do líquido, quando este refluíu pela agulha.

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

Foram administrados 5µL de solução por centímetro de medula espinal (0,17 a 0,19 mL), injetados em um segundo, em seringa descartável de 1mL.

### ***3.5.3 Soluções administradas***

As soluções utilizadas foram solução fisiológica a 0,9% (Grupo 2) e o cloridrato de bupivacaína a 0,5% em solução hiperbárica (Grupo 3), sintetizada pela indústria farmacêutica Cristália.

### ***3.5.4 Observação clínica***

Após a punção subaracnoidea ou a injeção da solução sorteada, os animais foram retirados da mesa e, quando recuperados da anestesia venosa, foram avaliados clinicamente quanto ao bloqueio motor e à sensibilidade dolorosa. O bloqueio motor foi avaliado pela observação clínica, baseado no critério estabelecido por Drummond & Moore<sup>58</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 dermatomos sacrais, lombares, torácicos e da orelha com auxílio de pinça dente de rato.

Os animais permaneceram em cativeiro durante três dias, sob observação clínica. Foram verificadas as alterações motoras baseando-se no critério de Drummond & Moore<sup>58</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.

### **3.6 Sacrifício**

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

### **3.7 Exame histológico**

As peças anatômicas permaneceram, durante sete dias, em solução de formalina. Os cortes transversais do tecido nervoso e das meninges foram iniciados, 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).

### **3.7.1 Técnica imunohistoquímica para GFAP**

Para a realização da técnica de imunohistoquímica 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; 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, e 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 imunohistoquímica, sendo os cortes cobertos por PBS (solução salina tamponada pH 7.2-7.4). Depois de retirado o excesso desta solução, receberam o anticorpo primário GFAP, clone 6F2 (Dako) previamente diluído a 1:400, permanecendo assim incubados 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 Hides Polímero (Cell Marque) durante 10 minutos, cada uma das incubações, em temperatura ambiente.

Os cortes novamente lavados em PBS foram revelados pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina (Cell Marque) e após a revelação foram lavados em água corrente e

contra corados em hematoxilina segundo Harris (MERCK) por 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.

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-aracnodite + 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.

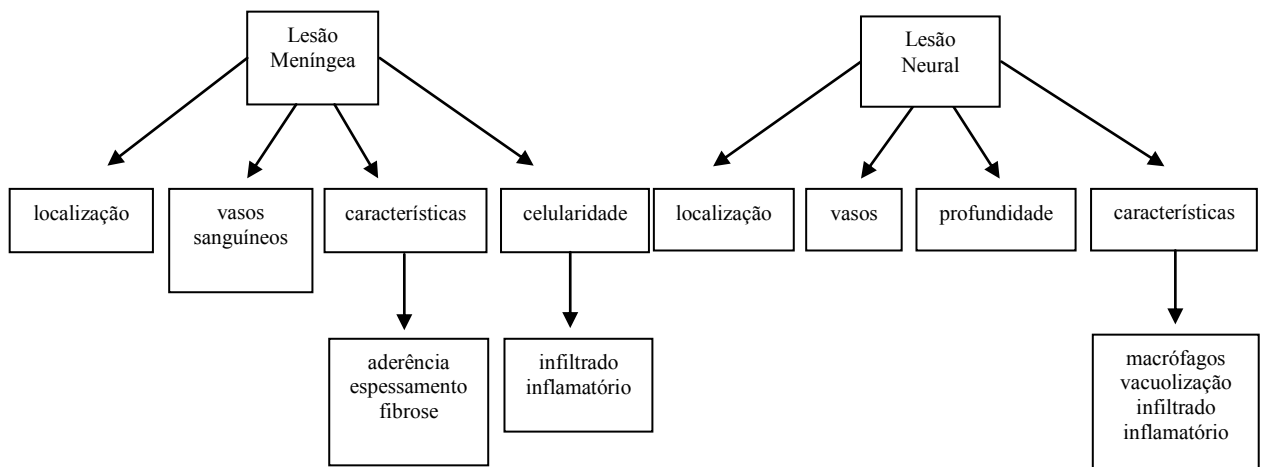
Na presença de aracnoidite adesiva:

- **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, realizada por três pesquisadores envolvidos no estudo.



Organograma da avaliação histológica

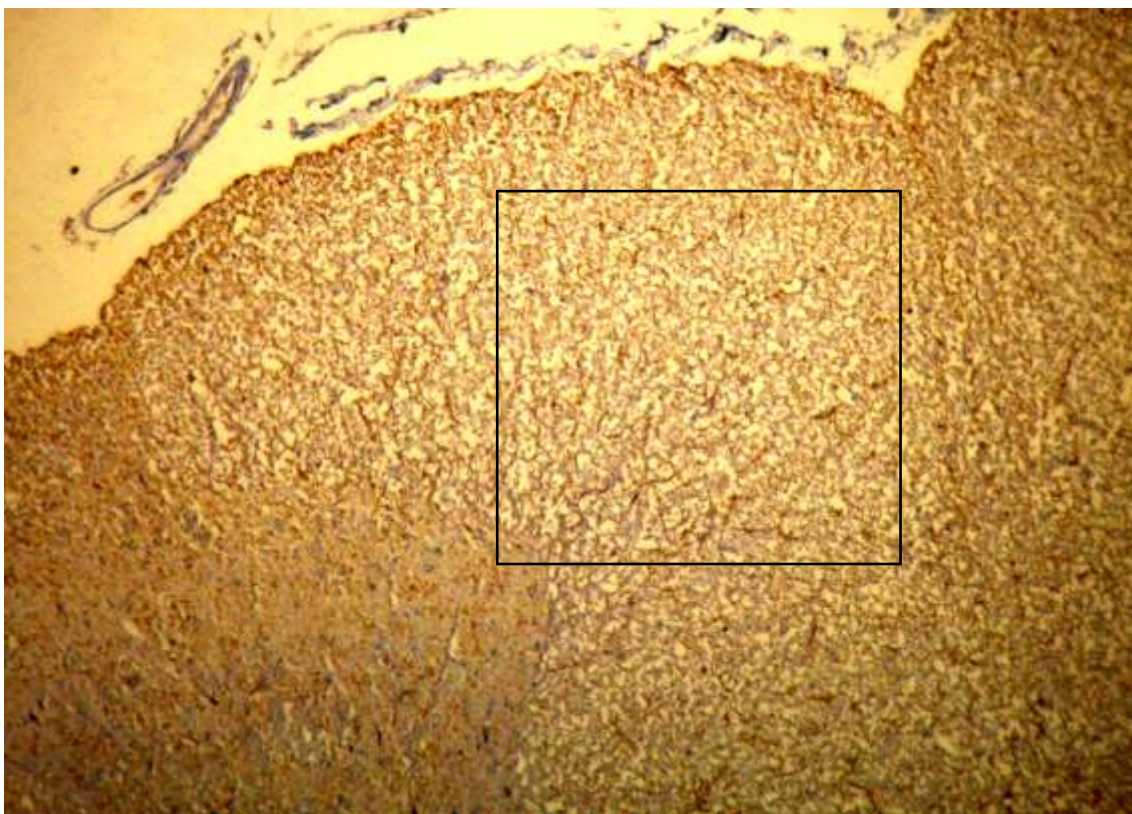
Para análise aprofundada da celularidade medular foi estimada a porcentagem do marcador celular a partir da avaliação da área imunohistologicamente marcada pela GFAP no corno dorsal da medula. Para tanto, os cortes histológicos corados pela GFAP, após serem fotografados em resolução 1090x650, tipo JPG, 96dpi, 24 bits de cor, captadas imagens em microscópio Panoramic MIDI 3DHISTECH, sob objetiva 200x, foram submetidos a processamento digital segundo algoritmo abaixo (Quadro 1), empregando o software Image J 1.46 e o *plugin* “Color Deconvolution”.

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

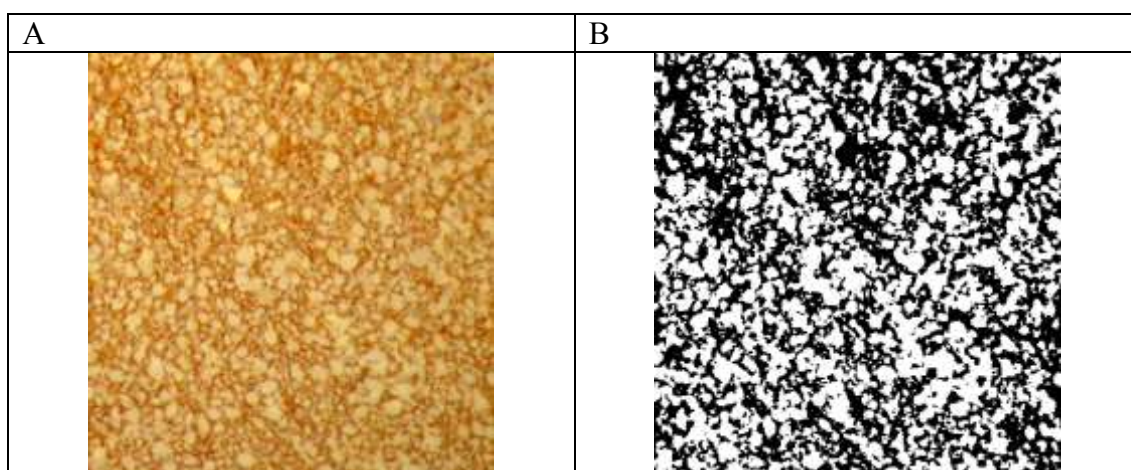
```
macro [1]" {
run("Colour Deconvolution", "vectors=[H&E DAB]");
}
macro [2]" {
run("Crop");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
run("Make Binary");
run("Measure");
run("Open Next");
}
macro [3]" {
selectImage(1);
run("Close");
selectImage(1);
run("Close");
selectImage(1);
run("Close");
selectImage(1);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

As imagens foram inicialmente separadas por seus vetores componentes da hematoxilina e DAB pelo *plugin* “Color deconvolution” (H-DAB). Após isso, foi selecionada uma área retangular do tecido e realizado o aumento do contraste, de forma padronizada, para a binarização da imagem (Figura 3).

Foi avaliado o percentual da área da imagem binarizada equivalente aos pixels do tecido marcado pelo cromógeno DAB (Figura 4), e comparadas as amostras entre os grupos<sup>59-62</sup>.



**Figura 3** - Segmento da região posterior da medula espinal. GFAP 200x. Exemplo de área utilizada para estimar o percentual de células marcadas.



**Figura 4** - A. Área selecionada do tecido neural. B. Área binarizada após o processamento da imagem, resultando em 45% do tecido marcado.



### **3.8 Comissão de Ética em Experimentação em Animal**

A presente pesquisa foi submetida à aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (Protocolo 774/2009).

### **3.9 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 envelopes selados. A preparação das soluções dos animais de G2 e G3 foi realizada por pesquisador não envolvido diretamente na realização da técnica.

A avaliação clínica dos animais após a recuperação da anestesia venosa e durante os três dias de cativeiro foi realizada por pesquisador que desconhecia qual o grupo a que pertencia o coelho.

### **3.10 Método estatístico**

Tendo como objetivo avaliar a homogeneidade dos grupos com relação ao peso, ao comprimento da medula espinal e ao volume da solução administrada no espaço subaracnoideo, foi realizada a análise de variância (ANOVA) como método estatístico (resultados expressos como média e desvio padrão). Para comparar os resultados percentuais das marcações histológicas das células pelo método GFAP foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (resultados apresentados como mediana, 1º e 3º quartis), sendo considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

Pressupondo-se uma estimativa de taxa de lesão do tecido nervoso de 70% e de taxa induzida de 1% para a solução fisiológica<sup>34</sup>, para um valor  $\alpha$  de significância de 5% (limite para detecção de erro tipo I) e um poder estatístico de 95%, foram necessários oito animais por grupo.

## 4 *Resultados*

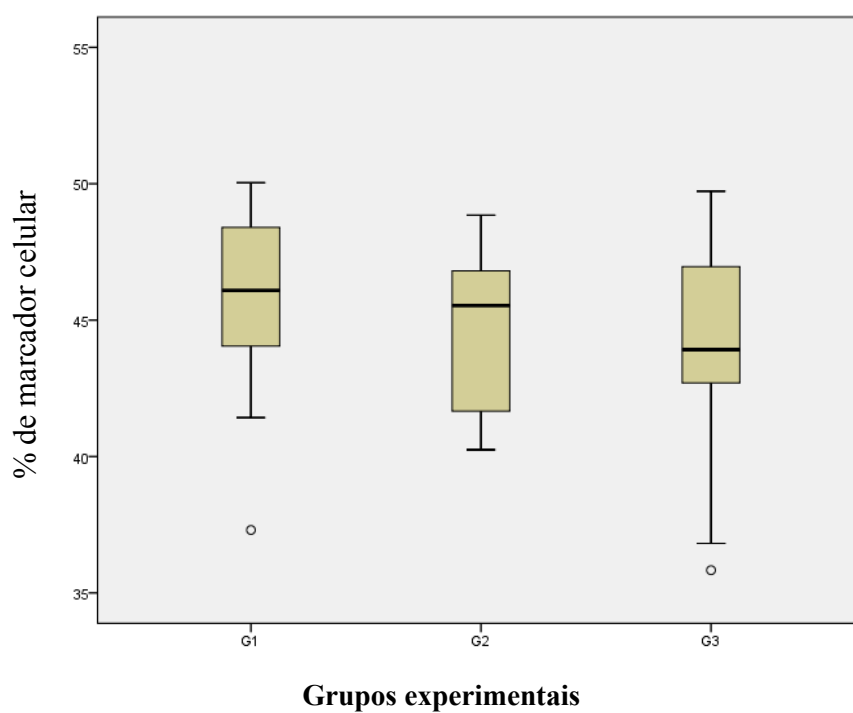
---

Nenhum animal selecionado foi excluído do experimento. Todos apresentavam aspecto sadio e não houve necessidade de mais de uma punção.

A análise estatística dos resultados referentes ao peso ( $p=0,75$ ), ao comprimento da medula espinal ( $p=0,85$ ), ao volume de solução introduzido no espaço subaracnoideo ( $p=0,86$ ) e à porcentagem do tecido marcado pela GFAP ( $p=0,42$ ) mostrou que houve homogeneidade entre os grupos (Tabela 1, Figura 5).

**Tabela 1** – Peso (g), comprimento de medula espinal (cm), volume de solução injetado no espaço subaracnoideo (ml) e porcentagem (%) de tecido marcado pela GFAP. Resultados expressos em média  $\pm$  DP

	G1	G2	G3	Estatística
peso (g)	3840 $\pm$ 340	3830 $\pm$ 131	3800 $\pm$ 390	p = 0,75
comprimento da medula (cm)	36,27 $\pm$ 1,28	36,07 $\pm$ 1,53	36,00 $\pm$ 1,31	p = 0,85
volume injetado (mL)		0,18 $\pm$ 0,001	0,18 $\pm$ 0,01	p = 0,86
% de tecido marcado pela GFAP	45,84 $\pm$ 3,45	44,80 $\pm$ 3,02	44,12 $\pm$ 4,09	p=0,42



**Figura 5** – Box Plot da mediana, 1° e 3° quartis do percentual das células do tecido nervoso marcadas pela GFAP nos grupos estudados.

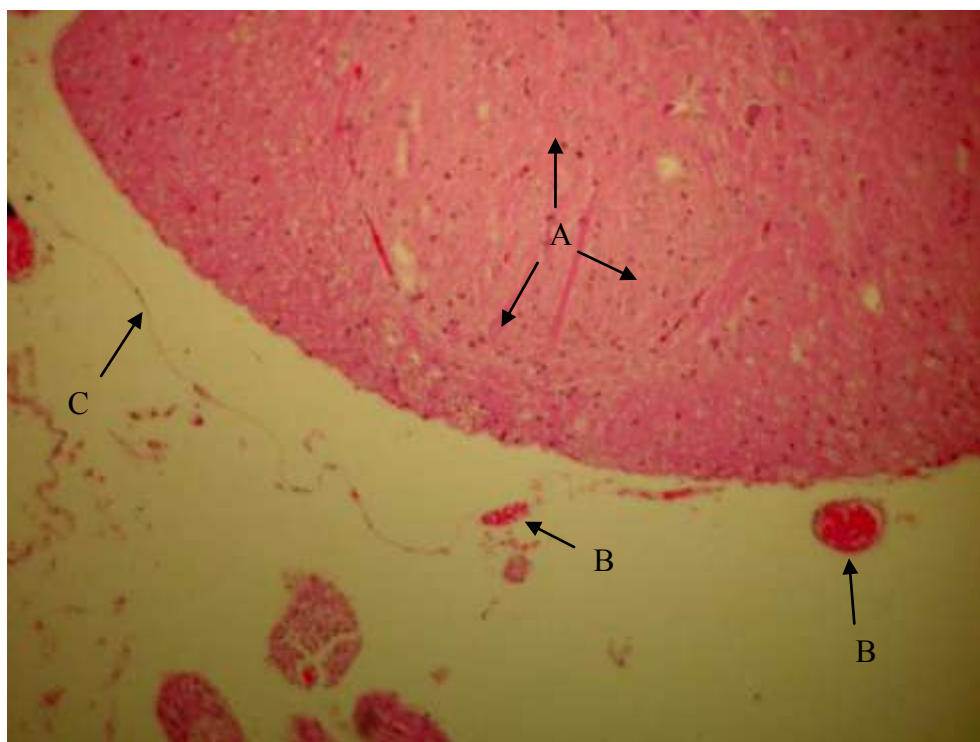
Nenhum animal dos grupos 1 e 2 (G1 e G2) apresentou bloqueio sensitivo ou motor após a recuperação da anestesia venosa (Tabelas 2 e 3). Todos os animais do grupo 3 (G3) apresentaram bloqueio sensitivo na extremidade inferior ou na região sacral e bloqueio motor em graus variados (três coelhas com bloqueio grau 0 – paralisa das extremidades inferiores; cinco animais com bloqueio grau 1 – inabilidade para sustentar o corpo pelas extremidades inferiores e sete coelhas com bloqueio grau 2 – assimetria para sustentar o corpo pelas extremidades inferiores), durante o período em que estavam sob efeito do anestésico local (Tabela 4).

Após a reversão do bloqueio subaracnoideo os animais do grupo 3 (G3) recuperaram a sensibilidade dolorosa e a motricidade.

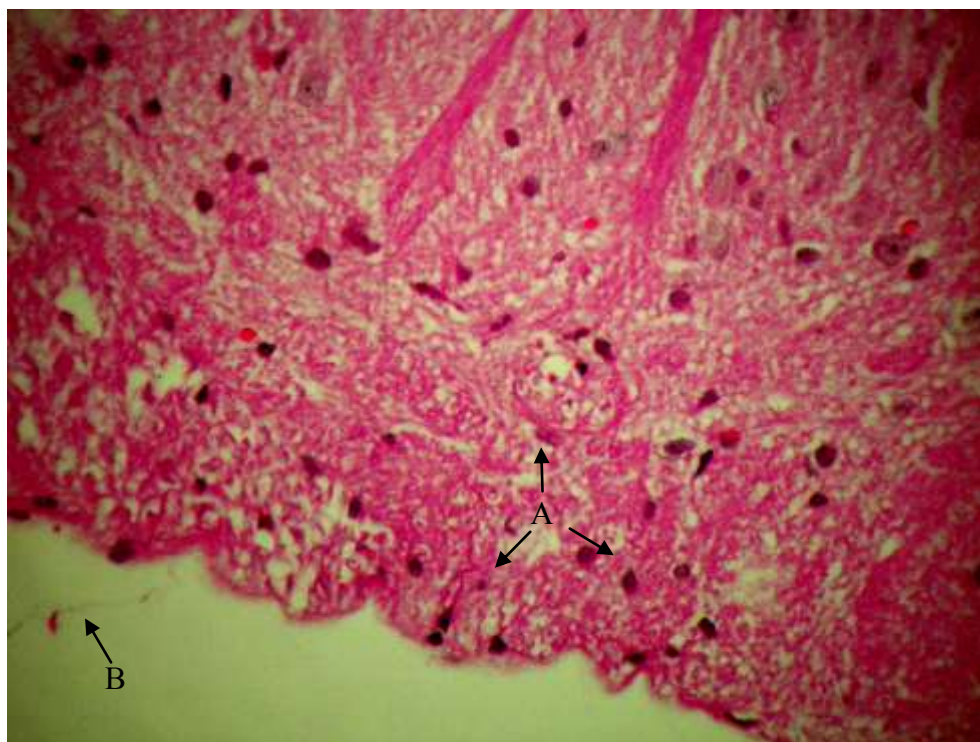
Todas as coelhas pertencentes aos três grupos permaneceram sem alterações sensitivas e motoras durante os três dias de cativeiro sob observação clínica.

A análise dos cortes histológicos do tecido nervoso, das meninges e dos vasos sanguíneos foi normal em quarenta e quatro animais (Figuras 6, 7, 8 e 9). Em apenas um animal do grupo 2 (G2) (nº 3) foi observada lesão do tecido nervoso caracterizada por infiltrado inflamatório linfo-histiocitário com perda de substância (necrose) na substância cinzenta, em área inferior a 1% do campo histológico e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular em meninges, em um único corte com localização distante (sete centímetros acima) do local da punção (Figuras 10, 11, 12 e 13). Nos cortes avaliados pela imuno-histoquímica a coloração marrom acastanhada corresponde ao acúmulo de GFAP no citosol das células.

Em apenas um animal do grupo 1 (G1) (nº 40) houve dificuldade na visibilidade das estruturas pelo ultrassom, a qual foi sanada com o reposicionamento do transdutor do aparelho.



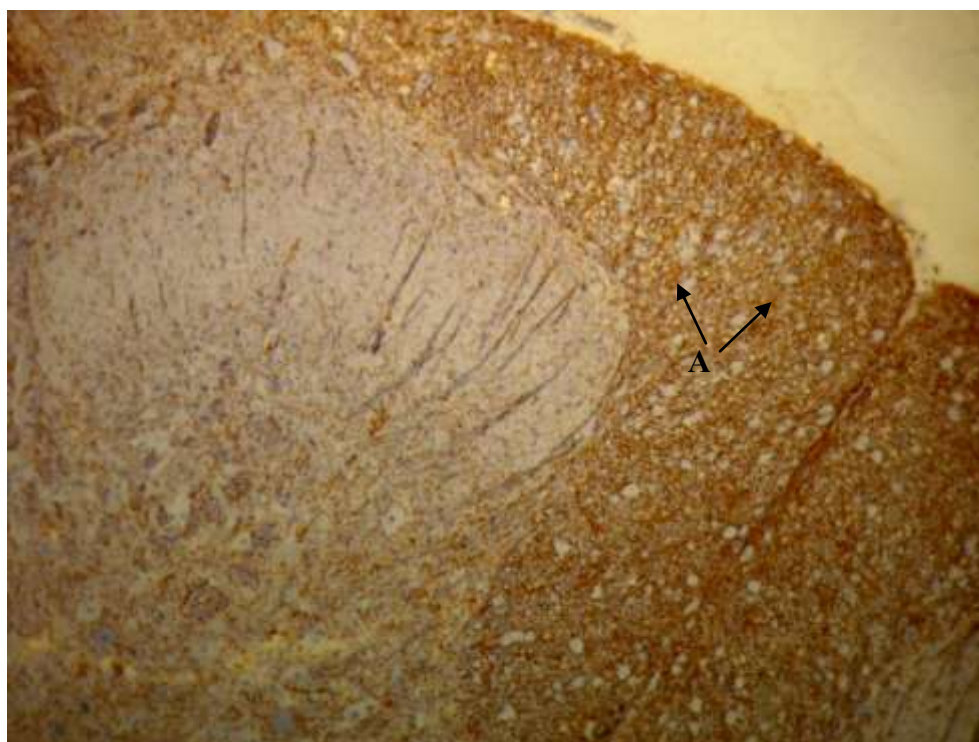
**Figura 6** – Tecido nervoso (A), vasos (B) e meninges (C) normais. HE 100x.



**Figura 7** – Tecido nervoso (A) e meninges (B) normais. HE 200x.

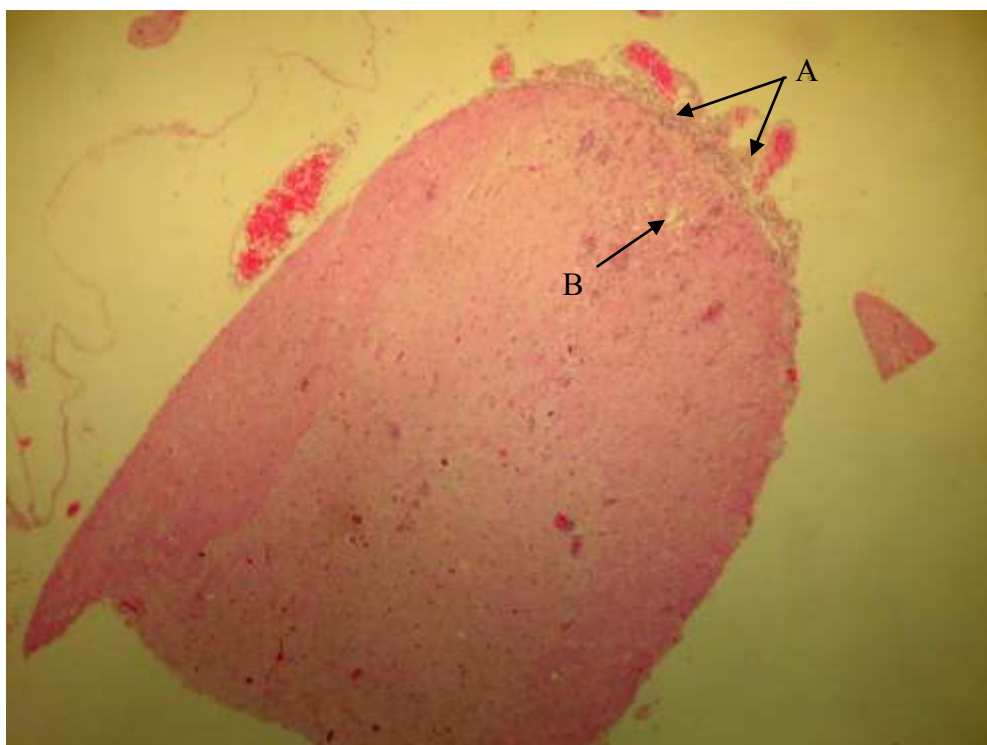


**Figura 8** – Tecido nervoso (A), vasos (B) e meninges (C) normais. GFAP 100x.

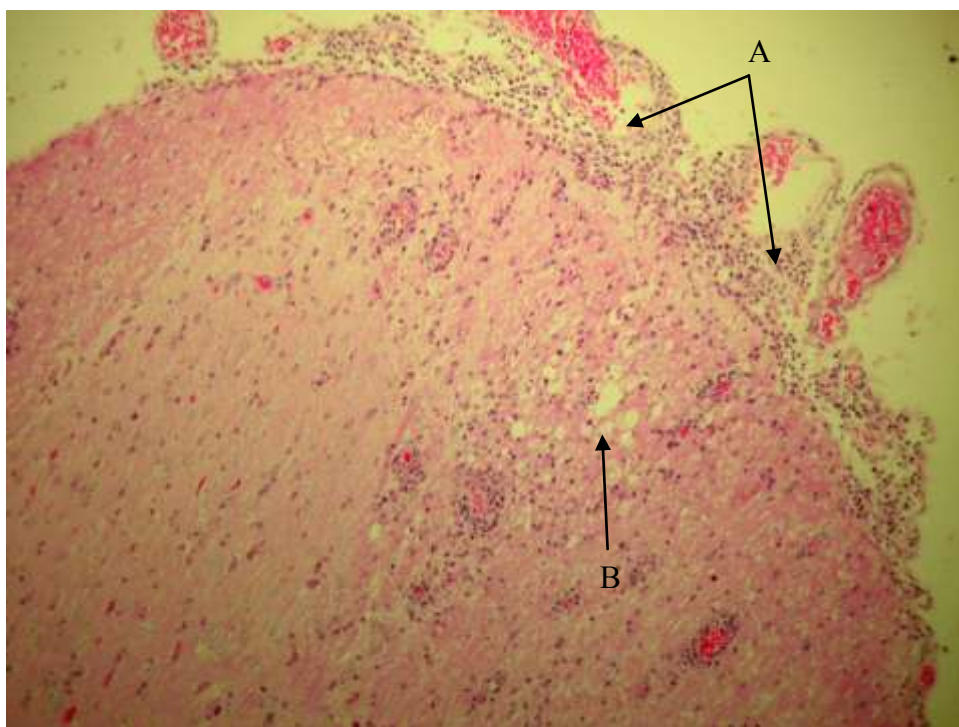


**Figura 9** – Tecido nervoso normal (A). GFAP 40x.

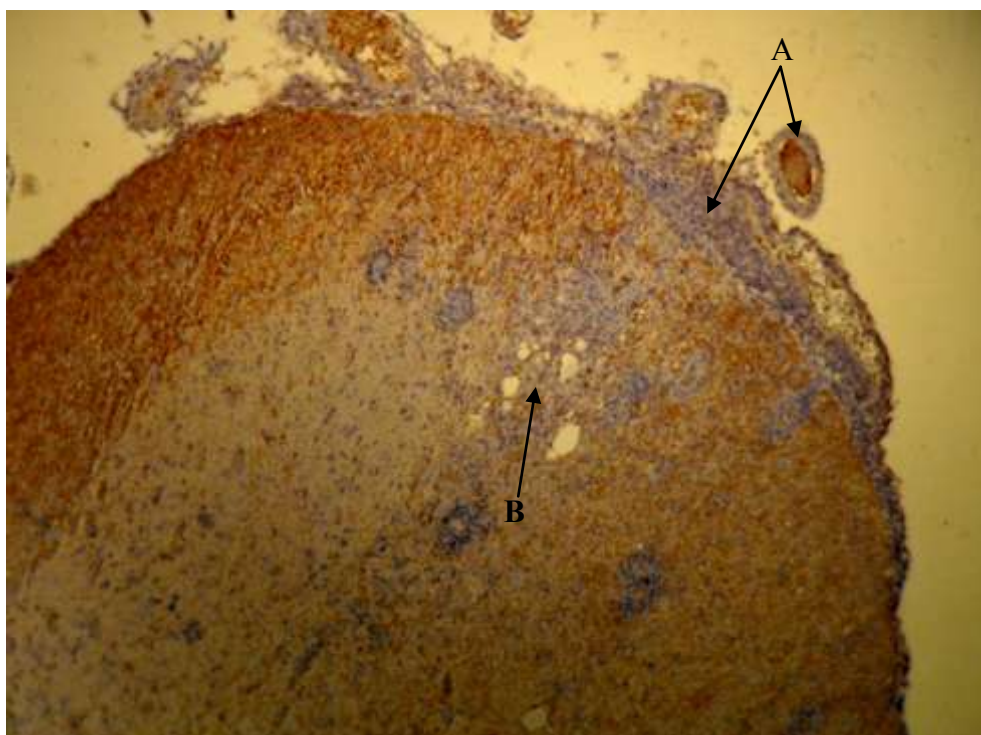




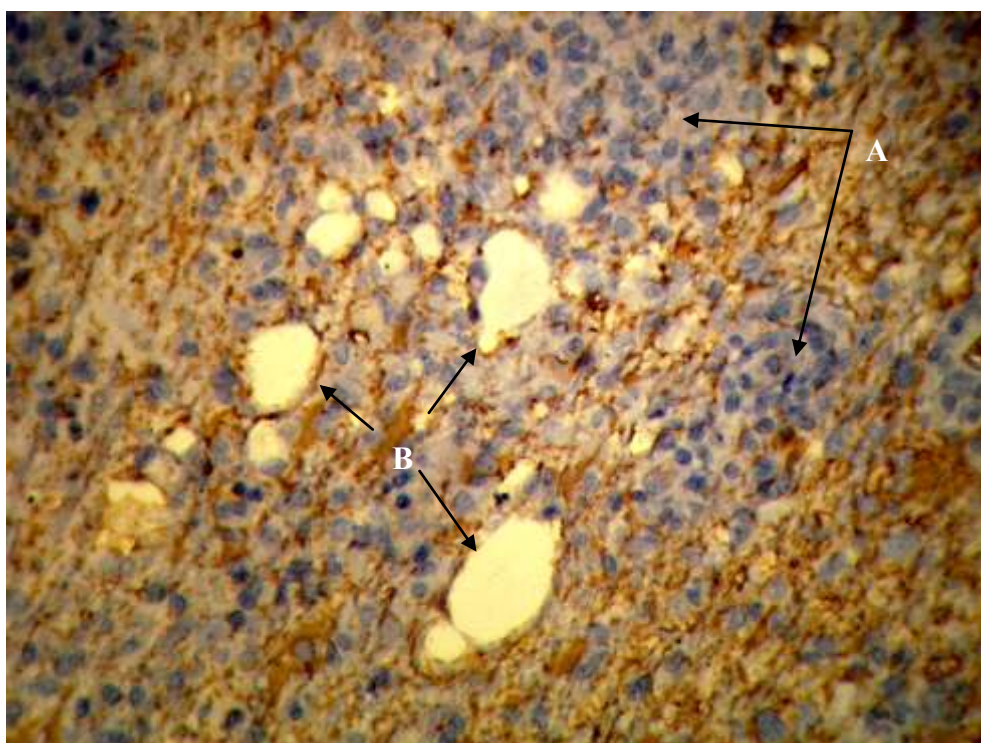
**Figura 10** - Infiltrado linfoplasmocitário perivascular em meninges (A), infiltrado linfohistiocitário e necrose (B) na substancia cinzenta . HE 40x.



**Figura 11** - Infiltrado linfoplasmocitário perivascular em meninges (A), infiltrado linfohistiocitário e necrose (B) na substancia cinzenta . HE 100x.



**Figura 12** - Infiltrado linfoplasmocitário perivascular em meninges (A), infiltrado linfohistiocitário e necrose (B) na substancia cinzenta . GFAP 100x.



**Figura 13** - Infiltrado linfo-histiocitário (A) e necrose (B) na substancia cinzenta. GFAP 200x.

**Tabela 2** – Peso (g), comprimento de medula espinal (cm), volume injetado (mL), presença de líquido, dificuldade de visualização do espaço, observação clínica (inicial e nos 3 dias de cativeiro) e resultados histológicos (Hematoxilina-eosina: HE) dos animais pertencentes ao G1.

Nº	Peso (g)	Comprimento de medula (cm)	Volume injetado (mL)	Presença de líquido	Dificuldade	Observação clínica		Resultado histológico
						Após a punção	Após 3 dias	HE
1	4400	38	0,19	não	não	normal	normal	normal
4	3400	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
7	3150	38	0,19	não	não	normal	normal	normal
11	4350	38	0,19	sim	não	normal	normal	normal
15	4000	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
21	3500	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
23	4100	38	0,19	não	não	normal	normal	normal
27	4200	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
28	4000	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
30	4000	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
32	4100	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
34	3900	34	0,17	não	não	normal	normal	normal
40	3200	34	0,17	não	sim*	normal	normal	normal
43	3800	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
45	3800	36	0,18	não	não	normal	normal	normal

\* No coelho de número 40 houve dificuldade na visibilidade do espaço subaracnoideo pelo ultrassom, porém o espaço pode ser identificado e a punção realizada.

**Tabela 3** – Peso (g), comprimento da medula espinal (cm), volume injetado (ml), presença de líquido, dificuldade de visualização do espaço, observação clínica (inicial e nos 3 dias de cativeiro) e resultados histológicos ( Hematoxilina-eosina: HE) dos animais pertencentes ao G2

Nº	Peso (g)	Comprimento de medula (cm)	Volume injetado (ml)	Presença de líquido	Dificuldade	Observação clínica		Resultado histológico
						Após a punção	Após 3 dias	HE
2	3600	38	0,19	não	não	normal	normal	normal
3	4000	38	0,19	não	não	normal	normal	foco de necrose
8	4200	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
12	4000	34	0,17	não	não	normal	normal	normal
13	3800	38	0,18	não	não	normal	normal	normal
16	3800	34	0,17	não	não	normal	normal	normal
17	3200	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
19	4100	38	0,19	não	não	normal	normal	normal
24	4000	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
29	3800	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
35	3800	34	0,17	não	não	normal	normal	normal
36	4200	36	0,18	não	não	normal	normal	normal
38	3200	34	0,17	não	não	normal	normal	normal
41	4100	38	0,19	não	não	normal	normal	normal
42	3700	36	0,18	não	não	normal	normal	normal

**Tabela 4** – Peso (g), comprimento da medula espinal (cm), volume injetado (ml), presença de líquor, dificuldade de visualização do espaço, observação clínica (inicial e nos 3 dias de cativeiro) e resultados histológicos ( Hematoxilina-eosina: HE) dos animais pertencentes ao G3

Nº	Peso (g)	Comprimento de medula (cm)	Volume injetado (ml)	Presença de líquor	Dificuldade	Observação clínica		Resultado histológico
						Após a punção	Após 3 dias	HE
5	3800	38	0,19	não	não	Bm: 1 Bs: sacral	normal	normal
6	3200	38	0,19	não	não	Bm 0 Bs: sacral	normal	normal
9	3400	36	0,18	sim	não	Bm: 2 Bs: sacral	normal	normal
10	4000	36	0,18	sim	não	Bm: 1 Bs:extremidades inferiores	normal	normal
14	4370	38	0,19	sim	não	Bm:0 Bs: extremidades inferiores	normal	normal
18	3400	36	0,18	não	não	Bm: 0 Bs: extremidades inferiores	normal	normal
20	4200	36	0,18	não	não	Bm: 2 Bs: extremidades inferiores	normal	normal
24	4100	36	0,18	não	não	Bm: 1 Bs: extremidades inferiores	normal	normal
25	3500	36	0,18	não	não	Bm: 2 Bs: sacral	normal	normal
26	3800	36	0,18	não	não	Bm: 1 Bs: extremidades inferiores	normal	normal
31	4400	36	0,18	não	não	Bm: 1 Bs: extremidades inferiores	normal	normal
33	4100	36	0,18	não	não	Bm: 2 Bs: extremidades inferiores	normal	normal
37	3800	34	0,17	não	não	Bm: 2 Bs: extremidades inferiores	normal	normal
39	3500	34	0,17	não	não	Bm: 2 Bs: extremidades inferiores	normal	normal
44	3400	34	0,17	não	não	BM: 2 Bs: extremidades inferiores	normal	normal

Bm – bloqueio motor, Bs – bloqueio sensitivo

## 5 *Discussão*

---

A utilização do ultrassom para realização da punção subaracnoidea de coelhos mostrou-se método útil para prover a localização correta do espaço subaracnoideo.

Muitos modelos experimentais para estudo da neurotoxicidade em coelhos utilizam cateteres. Estes são introduzidos no espaço subaracnoideo através da membrana atlanto-occipital, percorrem todo trajeto da medula espinal e o orifício de escoamento das soluções localiza-se distalmente aos nervos lombares e sacrais, de acordo com a técnica preconizada por Yaksh & Rudy<sup>63</sup>. Esta técnica apresenta como desvantagem a possibilidade de aparecimento de lesão no cone medular secundária à mobilidade da porção distal do cateter<sup>64</sup>.

Outros autores abordam o espaço lombo-sacro para a introdução do cateter no espaço subaracnoideo<sup>38</sup>. É descrita, como desvantagem da técnica, a possibilidade de ocorrer algum grau de alteração histológica desencadeada pelo cateter.

Quando alocado no espaço peridural, estudos realizados em diferentes espécies mostraram, nos animais do grupo controle, a presença de células inflamatórias e espessamento meníngeo em áreas próximas à ponta do cateter e em torno dos nervos espinais<sup>65-68</sup>, além de mielopatia degenerativa subpial estendendo-se da substância branca até o interior da cinzenta<sup>69</sup>.

Aumento no número de células microgliais na substância cinzenta e nas leptomeninges<sup>47</sup> também foi observado ao redor dos cateteres introduzidos no espaço subaracnoideo.

A ativação glial apresenta correlação com a lesão e a 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>70</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 respostas inicialmente observadas. Os astrócitos aumentam de tamanho porque contêm grandes quantidades de organelas citoplasmáticas e, em particular, grandes quantidades de GFAP<sup>71</sup>. Existem evidências de que a microglia pode contribuir diretamente para, ou exacerbar a degeneração neuronal<sup>72.73</sup>. Assim sendo, a dosagem da GFAP serve de marcador precoce da lesão neural<sup>50</sup>.

Na presente pesquisa não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto à porcentagem da área marcada pela técnica imunohistoquímica utilizada, mostrando que a técnica de punção empregada para acessar o espaço subaracnoideo não lesou o tecido nervoso. Tal fato é de importância porque a medula espinal do coelho pode se estender até o meio do osso sacro<sup>8</sup> e as punções realizadas em S1-S2, como neste estudo, assim como na junção lombo-sacra, são passíveis de provocar trauma mecânico na medula<sup>37</sup> e lesões do tecido nervoso.



A visibilidade das estruturas permitiu o posicionamento correto da agulha, o que evitou o trauma de vasos e de estruturas nervosas, assim como injeções intraneurais de soluções.

Há muito é conhecido que, em nervos periféricos de coelhos, o trauma desencadeado pela introdução da agulha dentro dos fascículos desencadeia lesões neuronais graves<sup>74</sup>. Foram descritas rotura intraneuronal, degeneração axonal distal e regeneração desorganizada das fibras nervosas após a introdução da agulha no interior de nervos periféricos de ratos<sup>75</sup>.

Nos animais do grupo 1 (G1), submetidos somente à punção subaracnoidea com o objetivo de avaliar a segurança da técnica utilizada em não provocar acidente de punção, não foram observadas lesões no tecido nervoso e nas meninges. Ficou demonstrado que a agulha de punção, guiada pela imagem do ultrassom, não ocasionou trauma neste tecido.

Os animais do grupo 2 (G2), que receberam a solução salina por via subaracnoidea, tiveram por finalidade estudar os efeitos que o volume da solução administrada determinaria sobre o tecido nervoso. Em um coelho foi observada área focal, inferior a 1%, de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário na substância cinzenta com perda de substância (necrose) e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular nas meninges, em local distante daquele em que foi realizada a punção, o que torna difícil relacionar este achado histológico com a técnica utilizada.

O espaço subaracnoideo do coelho no local em que foi realizada a punção, que é o mais caudal que permite a passagem da agulha, é pequeno e ainda contém o tecido medular<sup>56</sup>. Como neste ponto a medula espinal está muito próxima da dura-máter e da aracnóide e a quantidade de líquido é mínima, suficiente apenas para manter a superfície

do tecido nervoso úmida<sup>37</sup>, foi imperativo que o volume da solução administrada não fosse fator desencadeador de lesões nervosas.

Alguns autores aventaram a hipótese de que aumentos agudos no volume do líquido podem levar ao aumento na pressão liquórica, comprometendo o fluxo sanguíneo medular e causando isquemia medular com o surgimento de lesões neurológicas<sup>76</sup>. Somando-se ao descrito, os coelhos pertencentes ao grupo 2 (G2) serviram também para excluir eventual injeção intraneural da solução. A injeção de solução fisiológica, em volume de 0,05 mL, no interior dos fascículos de nervos periféricos de coelhos, foi suficiente para degenerar os axônios<sup>74,75</sup>.

Foi relatada a ocorrência de laceração de tecido nervoso, caracterizada por faixa linear de necrose e hemorragia percorrendo desde a periferia até o centro da medula, no local em que foi realizada a punção seguida da administração subaracnoidea de solução fisiológica em coelhos<sup>43</sup>. Esse padrão de lesão histológica difere daquela desencadeada pela toxicidade da solução de anestésico local, que pode comprometer tanto as áreas superficiais quanto as profundas de tecido nervoso<sup>8,43</sup>.

Adams et al.<sup>43</sup> observaram a presença de nódulo glial isolado, provavelmente resultado de processo inflamatório, na região cervical de coelho. Este animal pertencia ao grupo que recebeu solução fisiológica por punção única do espaço subaracnoideo, em nível lombo-sacro. Os autores inferiram que o achado histológico não se correlacionava à metodologia do estudo, estando anteriormente presente neste animal.

Os animais deste estudo pertencentes ao grupo 3 (G3), que receberam bupivacaína hiperbárica a 0,5%, tiveram por objetivo avaliar os efeitos do fármaco sobre o tecido nervoso. Este anestésico local, nesta concentração, já foi administrado no

espaço subaracnoideo de ovelhas<sup>77</sup> e de cães<sup>24</sup> e não desencadeou lesões neurotóxicas, mostrando ser fármaco seguro para ser utilizado como controle da droga.

No cão, foi observada degeneração do tecido nervoso em 10% dos animais que receberam, pela via subaracnoidea, a bupivacaína hiperbárica em concentração de 1%, ou seja, o dobro da concentração utilizada rotineiramente na clínica anestesiológica e, em 40% naqueles que receberam a bupivacaína hiperbárica em concentração quatro vezes superior à utilizada em anestesia (concentração de 2%)<sup>24</sup>.

Em coelhos submetidos à punção única, a injeção subaracnoidea de bupivacaína desencadeou lesões histológicas a partir da concentração de 1%, que foi a menor concentração utilizada pelo autores<sup>8</sup>.

Quanto ao volume de solução administrada no espaço subaracnoideo, estudo que utilizou o mesmo cálculo que o desta pesquisa mostrou, com auxílio de corantes, que o volume de  $5 \mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$  de medula espinal foi suficiente para banhar o tecido nervoso nas regiões torácica baixa, lombar, sacral e caudal<sup>8</sup>. Na presente pesquisa, pode-se observar que o bloqueio da sensibilidade dolorosa se estendeu somente até os níveis lombares.

Outros autores que utilizaram volumes maiores ( $0,02 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-1}$  de medula) constataram que 50% dos animais estudados apresentavam lesões histológicas no local da punção, realizada no espaço lombo-sacral. As lesões eram compatíveis com trauma de punção, diferentes daquelas desencadeadas por toxicidade do tecido nervoso pelo anestésico local (edema de axônio e de bainha de mielina, infiltrado inflamatório macrofágico, degeneração axonal e presença de vacúolos)<sup>43</sup>.

A vantagem de se utilizar o coelho para estudar toxicidade de fármacos no espaço subaracnoideo se deve ao fato de que, em decorrência do pequeno volume de

líquor<sup>37</sup>, a solução administrada é pouco diluída no espaço subaracnoideo permitindo que a concentração introduzida seja muito próxima daquela em contato com o tecido nervoso. A desvantagem é que não existe o efeito de diluição do agente no líquido, como ocorre nos animais que possuem maior volume de líquido.

O maior obstáculo observado foi encontrar a posição adequada do transdutor do ultrassom que não dificultasse a introdução da agulha de punção na pele e tecido celular subcutâneo.

## *6 Conclusão*

---

A imagem gerada pelo ultrassom pode auxiliar na correta identificação do espaço subaracnoideo, evitando-se traumas de estruturas e injeções intraneurais de soluções, podendo ser utilizada no estudo da neurotoxicidade de fármacos e soluções.

## *7 Referências*

---

1. Aromaa U, Lahdensuu M, Cozanitis DA. Severe complications associated with epidural and spinal anaesthesias in Finland 1987-1993. A study based on patient insurance claims. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997 Apr;41(4):445-52.
2. Auroy Y, Narchi P, Messiah A, Litt L, Rouvier B, Samii K. Serious complications related to regional anesthesia. *Anesthesiology*. 1997 Sep;87(3):479-86.
3. Dahegren N, Törnebrandt K. Neurological complications after anaesthesia. A follow-up of 18000 spinal and epidural anaesthetics performed over three years. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1995 Oct; 39(7):872-880.
4. Vianna PTG, Vane LA, Yong LC. Alterações morfológicas da medula espinhal em cães submetidos à injeção hiperbárica de tetracaína a 1,2%, lidocaína a 5% e glicose a 10%. *Rev Bras Anesthesiol*. 1985;35(suppl.5):S1-S6.
5. Rice I, Wee MY, Thomson K. Obstetric epidurals and chronic adhesive arachnoiditis. *Br J Anaesth*. 2004 Jan;92(1):109-20.
6. Rigler ML, Drasner K, Krejcie TC, Yelich SJ, Scholnick FT, DeFontes J et al. Cauda equina syndrome after continuous spinal anesthesia. *Anesth Analg*. 1991 Mar;72(3):275-81.
7. Myers RR., Sommer C. Methodology for spinal neurotoxicity studies. *Reg Anesth*. 1993 Nov-Dec;18(6 Suppl):439-47.
8. Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, Austin E, Sumi SM. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology*. 1985 Oct;63(4):364-70.
9. Hoffman GS. Spinal arachnoiditis. What is the clinical spectrum? *Spine (Phila Pa 1976)*. 1983 Jul-Aug;8(5):538-40.
10. 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.



11. Ganem EM, Vianna PTG, Marques M, Módolo NSP, Braz JRC. Effects of hyperbaric 0,5% bupivacaine contaminated with antiseptic solutions on spinal cord and meninges. Experimental study in dogs. *Reg Anesth.* 1993; 18 (S):42.
12. Barros GAM, Marques ME, Gaem 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.
13. Lima RM, Barros GAM, Marques ME, Navarro LHC, Modolo NSP, Pimenta ADB, Vane LA, Ganem EM. Effects of spinal administration of methylprednisolone on the spinal cord and the meninges. Experimental study in dogs. Book of Abstracts 12<sup>th</sup> World Congress on Pain, 2008; PH16.
14. Fukushima FB, Barros GAM, Marques MEA, Vidal EIO, Ganem EM. The neuraxial effects of intraspinal amitriptyline at low concentrations. *Anesth Analg.* 2009 Sep;109(3):965-71.
15. Jaradeh S. Cauda equina syndrome: A neurologist's perspective. *Reg Anesth.* 1993 Nov-Dec;18(6 Suppl):473-80.
16. 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.
17. Kane RE. Neurologic deficits following epidural or spinal anesthesia. *Anesth Analg.* 1981 Mar;60(3):150-61.
18. Sourasky M, Leeds MD. Overdose in spinal analgesia. *Br Med J.* 1926;18:524.
19. Ferguson FR, Watkins KH. Paralysis of the bladder and associated neurological sequelae of spinal anaesthesia (cauda equina syndrome). *Br J Surg.* 1938, 25:735-52.
20. Nicholson MJ, Eversole UH. Neurologic complications of spinal anesthesia. *J Am Med Ass.* 1946;132:679-85.

21. Schell RM, Brauer FS, Cole DJ, Applegate RL. Persistent sacral nerve root deficits after continuous spinal anaesthesia. *Can J Anaesth*. 1991 Oct;38(7):908-11.
22. Rigler ML, Drasner K. Distribution of catheter-injected local anesthetic in a model of the subarachnoid space. *Anesthesiology*. 1991 Oct;75(4):684-92.
23. Lambert DH, Hurley RJ. Cauda equina syndrome and continuous spinal anesthesia. *Anesth Analg*. 1991 Jun;72(6):817-9.
24. Ganem EM, Vianna PTG, Marques M, Castiglia YM, Vane LA. Neurotoxicity of subarachnoid hiperbaric bupivacaine in dogs. *Reg Anesth*. 1996 May-Jun;21(3):234-8.
25. Cheng AC. Intended epidural anesthesia as possible cause of cauda equina syndrome. *Anesth Analg*. 1994 Jan;78(1):157-9.
26. Drasner K, Rigler ML, Sessler DI, Stoller ML. Cauda equina syndrome following intended epidural anesthesia. *Anesthesiology*. 1992 Sep;77(3):582-5.
27. Lee DS, Bui T, Ferrarese J, Richardson PK. Cauda equina syndrome after incidental total spinal anesthesia with 2% lidocaine. *J Clin Anesth*. 1998 Feb;10(1):66-9.
28. Loo CC, Irestedt L. Cauda equina syndrome after spinal anaesthesia with hyperbaric 5% lidocaine: a review of six cases of cauda equina syndrome reported to the Swedish pharmaceutical insurance 1993-1997. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1999 Apr;43(4):371-9.
29. Drasner K, Rigler ML. Repeat injection after a “failed spinal”; at times, a potentially unsafe practice. *Anesthesiology*. 1991 Oct;75(4):713-4.
30. Hodgson PS, Neal JM, Pollock JE, Liu SS. The neurotoxicity of drugs given intrathecally (spinal). *Anesth Analg*. 1999; 88:797-809.

31. Vianna PTG, Resende LAL, Ganem EM, Gabarra RC, Yamahita S, Barreira AA. Cauda equina syndrome after spinal tetracaine; electromyographic evaluation – 20 years follow-up. *Anesthesiology*. 2001 Nov;95(5):1290-1.
32. Ganem EM, Vianna PTG, Castiglia YMM, Braz JRC, Nascimento Jr P, Vane LA. Effects of different doses of tenoxican on spinal cord and meninges. Experimental study in dogs. *Bras J Anesthesiol*. 2000;50:60-62.
33. Ganem EM, Vianna PTG, Marques ME, Castiglia YMM, Vane LA. Efeitos da administração de grandes volumes de lidocaína a 2% e de ropivacaína a 1% sobre a medula espinhal e a meninges. Estudo experimental no cão. *Rev Bras Anesthesiol*. 2003 Jun;53(3):351-60.
34. Okagawa SR, Marques ME, Barros GAM, Ganem EM. 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.
35. Rojas AC, Alves JG, Lima RM, Barros GAM, Marques ME, Fukushima FB et al. The effects of subarachnoid administration of preservative-free S (+)-ketamine on spinal cord and meninges in dogs. *Anesth Analg*. 2012 Feb;114(2):450-5.
36. Sabbe MB, Grafe MR, Pfeifer BL, Mirzai TH, Yaksh TL. Toxicology of baclofen continuously infused into the spinal intrathecal space on the dogs. *Neurotoxicology*. 1993 Winter;14(4):397-410.
37. Bieter RN, Cunningham RW, Lenz AO, McNearney JJ. Threshold anesthetic and lethal concentration of certain spinal anesthetics in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther*. 1936;57:221-44.
38. Malinovsky JM, Charles F, Baudrimont M, Péréon Y, Corre PL, Pinaud M et al. Intrathecal ropivacaine in rabbits: Pharmacodynamic and neurotoxicologic study. *Anesthesiology*. 2002 Aug;97(2):429-35.

39. 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 ropivacaine administered intrathecally in rabbits. *Anesth Analg.* 2003 Aug;97(2):512-9.
40. 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 Oct;93(4):1050-7.
41. 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 Jul;101(1):107-14.
42. Wang CB, 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 Apr;63(4):445-7.
43. Adams HJ, Mastro 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.
44. 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 Jan;88(1):56-62.
45. Hashimoto K, Karasawa F, Sayoh T. Intrathecal midazolam attenuates renal sympathetic nerve activity in rabbits. *Masui.* 1997 Aug;46(8):1059-65.
46. Demerel E, Ugur HC, Dolgun H, Kahilogulari G, Sargon ME, Egemen N et al. The neurotoxic effects of intrathecal midazolam and neostigmine in rabbits. *Anaesth Intensive Care.* 2006 Apr;34(2):218-23.

47. Borgbjerg FM, Svensson BA, Frigast C, Gordh T Jr. Histopathology after repeated intrathecal injections of preservative-free ketamine in rabbit: a light and electron microscopic examination. *Anesth Analg*. 1994 Jul;79(1):105-11.
48. Vranken JH, Troost D, Haan P, Pennings FA, Vegt MH, Dijkgraaf MGW et al. Severe toxic damage to the rabbit spinal cord after intrathecal administration of preservative-free S (+)-ketamine. *Anesthesiology*. 2006 Oct;105(4):813-8.
49. Saeki H, Matsumoto M, Kaneko S, Tsuruta S, Cui YJ, Ohtake K et al. Is intrathecal magnesium sulfate safe and protective against ischemic spinal cord injury in rabbits? *Anesth Analg*. 2004 Dec;99(6):1805-12.
50. DeLeo JA, Colburn RW, Rickman AJ, Yeager MP. Intrathecal catheterization alone induces neuroimmune activation in the rat. *Eur J Pain*. 1997;1(2):115-22.
51. Long JB, Petras JM, Mobley WC, Holaday JW. Neurological dysfunction after intrathecal injection of Dynorphin A (1-13) in rat. 1. Injection produces modify pharmacological responses. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988 Sep;246(3):1167-74.
52. 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(15):1347-54.
53. 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 Apr;37(3):307-13.
54. Grip G, Svensson BA, Gordh T Jr, Post C, Hartvig P. Histopathology and evaluation of potentiation of morphine-induced antinociception by intrathecal droperidol in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1992 Feb;36(2):145-52.
55. Brock-Utne JG, Kallichurum S, Mankowitz E, Downing JW. Effects of intrathecal saline and ketamine with and without preservative on the spinal nerve roots of monkeys. *S Afr Med J*. 1982 Mar 6;61(10):360-1.

56. 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.
57. Ting PH, Antonakakis JG. Evidence-based review of ultrasound imaging for regional anesthesia. Semin Anesth. 2007 Dez; 26(4): 218-28.
58. 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.
59. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. Anal Quant Cytol Histol. 2001 Aug;23(4):291-9.
60. Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram SJ. Image Processing with Image J. Biophotonics Int. 2004; 11:36-42.
61. Landini G. Colour Deconvolution. Atualizada em 2010, acesso em nov 2011, disponível em: <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>.
62. Collins TJ. Image J for microscopy. Biotechniques. 2007 Jul;43(1 Suppl):25-30.
63. Yaksh TL, Rudy T. Chronic catheterization on the spinal subarachnoid space. Physiol Behav. 1976 Dec;17(6):1031-6.
64. Sakura S, Hashimoto K, Bollen AW, Ciriales R, Drasner K. Intratecal catheterization in the rat: Improved technique for morphologic analysis of drug-induced injury. Anesthesiology. 1996 Nov;85(5):1184-9.
65. Malinovsky JM, Bernard JM, Baudrimont M, Dumand JB, Lepage JY. A chronic model for experimental investigation of epidural anesthesia in rabbits. Reg Anesth. 1997 Jan-Feb;22(1):80-5.
66. Kroin JS, McCarthy RJ, Penn RD, Kerns JM, Ivankovich AD. The effect of chronic subarachnoid bupivacaine infusion in dogs. Anesthesiology. 1987 Jun;66(6):737-42.

67. Kytta J, Heinonen E, Rosenberg PII, Wahlstrom T, Gripenberg J, Huipaniemi T. Effects of repeated bupivacaine administration on sciatic nerve and surrounding muscle tissue in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1986 Nov;30(8):625-9.
68. Yaksh TL, Noueihed RY, Durant PA. Studies of the pharmacology and pathology of intrathecally administered 4-anilinopiperidine analogues and morphine in the rat and cat. *Anesthesiology*. 1986 Jan;64(1):54-66.
69. Madsen JB, Jensen FM, Faber T, Bille-Hansen V. Chronic catheterization of the epidural space in rabbits: a model for behavioural and histopathological studies. Examination of meptazinol neurotoxicity. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1993 Apr;37(3):307-13.
70. Moore S, Thanos S. the concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog Neurobiol*. 1996 Mar-Apr;48(4-5):441-60.
71. O'Callaghan JP, Miller D. Nervous system-specific proteins as biochemical indicators of neurotoxicity. *TIPS*. 1983; 4:388-90.
72. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia*. 1993 Jan;7(1):111-8.
73. Merrill JE, Benveniste EN. Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci*. 1996 Aug;19(8):331-8.
74. 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 Anaesthesiol Scand*. 1979 Apr;23(2):127-36.
75. Rice AS, McMahan 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.

- 
76. Rosen MA, Baysinger CL, Shnider SM, Dailey PA, Norton M, Curtis JD et al. Evaluation of neurotoxicity after subarachnoid injection of large volumes of local anesthetic solutions. *Anesth Analg*. 1983 Sep;62(9):802-8.
77. Adams HJ, Mastri AR, Doherty D Jr. Bupivacaine: morphological effects on spinal cords of cats and durations of spinal anesthesia in sheep. *Pharmacol Res Commun*. 1977 Oct;9(9):847-55.