UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITO ANTINOCICEPTIVO MECÂNICO E NEUROTOXICIDADE DO MELOXICAM ADMINISTRADO POR VIA SUBARACNÓIDEA EM RATOS WISTAR

LANUCHA FIDELIS DA LUZ MOURA

PORTO ALEGRE
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITO ANTINOCICEPTIVO MECÂNICO E NEUROTOXICIDADE DO MELOXICAM ADMINISTRADO POR VIA SUBARACNÓIDEA EM RATOS WISTAR

Autora: Lanucha Fidelis da Luz Moura

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Cirurgia e Anestesiologia

Orientador: Prof Dr Emerson Antonio Contesini
Co-orientador: Prof Dr Nilson Oleskovicz

PORTO ALEGRE
2011

M929e Moura, Lanucha Fidelis da Luz
Efeito antinociceptivo e neurotoxicidade do meloxicam administrado por via subaracnóidea em ratos Wistar. / Lanucha Fidelis da Luz Moura;
Émerson Antonio Contesini, orient.– Porto Alegre : UFRGS, 2011.

100 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2011.

1. Cirurgia veterinária 2. Farmacologia veterinária: analgesia 3. Medicina veterinária: terapêutica 4. Antiinflamatórios não esteróides
I. Contesini, Émerson Antonio, Orient. II. Ileskovicz, Nilson III. Título.

Catalogação na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Lanucha Fidelis da Luz Moura

EFEITO ANTINOCICEPTIVO MECÂNICO E NEUROTOXICIDADE DO MELOXICAM ADMINISTRADO POR VIA SUBARACNÓIDEA EM RATOS WISTAR

Aprovada em 04 MAR 2011.

APROVADA POR:

_____

Professor Dr. Emerson Antonio Contesini
Faculdade de Veterinária – UFRGS
Orientador e Presidente da Banca

_____

Professor Dr. Aury Nunes de Moraes
Centro de Ciências Agroveterinárias – UDESC
Membro da Banca

_____

Professora Dra. Luise Meurer
Faculdade de Medicina – UFRGS
Membro da Banca

_____

Professor Dr. João Roberto Braga de Mello
Faculdade de Veterinária – UFRGS
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

À minha avó Maria Cerilha Moura, sempre. Por ter me dado as primeiras lições de veterinária e me transmitido seu amor pelos animais. Por ser até hoje uma fonte inesgotável de inspiração.

Aos meus pais, José Antônio e Silvânia, por me guiarem nos caminhos da vida e por terem me presenteado com o maior bem que alguém pode transmitir: a educação.

AGRADECIMENTOS

À minha família pela compreensão, paciência e apoio de sempre. Por fazerem tudo valer à pena e serem o motivo da minha vontade de ser cada vez melhor. À Ana, por tudo isso e por ser meu eterno corretor ortográfico pessoal, e ao Paulo, pela valiosa ajuda com as fotos e os vídeos.

Aos meus amigos, por compreenderem meus longos períodos de ausência, pelo eterno incentivo e por serem minha base de apoio.

Ao Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini pela orientação e confiança. A sua postura profissional e o amor pelo ensino são um grande exemplo e incentivo para mim.

Ao Prof. Dr. Nilson Oleskovicz, meu co-orientador, pelas ideias e conhecimentos compartilhados.

À Prof. Dra. Luise Meurer, que depositou sua confiança em mim e nesse trabalho, tornando possível sua realização. Por ter se tornado um exemplo pessoal e profissional para mim.

Aos meus colegas de pós-graduação, pelo incentivo e companheirismo.

Às minhas fiéis companheiras de experimentos, Anelise Bonilla Trindade, Víviam Nunes Pignone e Priscilla Mörschbächer, que mais do que simples colegas, foram grandes amigas e incentivadoras, e às quais nunca poderei agradecer o suficiente.

Aos meus queridos estagiários que me acompanharam desde a realização do experimento piloto e sem os quais esse estudo não seria possível. À Silvana Bellini Vidor, minha companheira de trabalho e de risadas, pela sorte de ter a tido como bolsista.

Ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em especial ao Saulo Pavarini, pela colaboração nas análises histopatológicas. Serei eternamente grata pela sua dedicação sem medidas.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em especial Marta, Fabíola e Eduardo, sempre disponíveis e atenciosos.

Ao Laboratório de Patologia Experimental do HCPA pelo processamento do material histológico. À Flavinha, pelo grande profissionalismo com que se dedicou à realização desse trabalho.

Ao Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da UFRGS, em especial aos professores Marcelo Meller Alievi e Afonso de Castro Beck, por permitirem a realização do estudo piloto.

Ao Biotério Central da UFRGS, em especial à Prof. Dra. Fernanda Mello, por ter gentilmente fornecido os animais do estudo piloto.

À UFRGS, por mais uma vez permitir minha realização profissional.

À CAPES/CNPQ, pela verba de incentivo à pesquisa.

A todos os animais sacrificados em prol desse estudo. Que ele contribua para o desenvolvimento de novos meios de aliviar a dor e o sofrimento em todas as espécies.

" Toda a ciência provém da dor. A dor procura sempre a causa das coisas, enquanto o bem-estar se inclina a estar quieto e a não olhar para trás."

Stefan Zweig

RESUMO

Evidências demonstram que ambas as isoformas da ciclooxigenase (COX) são constitutivamente expressas na medula espinhal (ME) de ratos, sendo COX-2 predominante no corno dorsal da medula espinhal (CDME) e podendo apresentar importante papel no desenvolvimento e manutenção da dor inflamatória. Assim, sugere-se que os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) possam exercer sua ação analgésica diretamente sobre o sistema nervoso central (SNC), e a administração espinhal desses fármacos tem despontado como uma alternativa no manejo da dor. O presente estudo objetiva, portanto, avaliar os efeitos da administração subaracnóidea (SA) do meloxicam em um modelo de dor inflamatória, bem como sua possível toxicidade sobre o SNC. Foram utilizados 27 ratos Wistar, machos, nos quais uma cânula SA foi implantada. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos e submetidos à administração de 5µL de solução salina (Grupo I – GI), 30µg de meloxicam (Grupo II – GII) ou somente à manutenção crônica da cânula SA (Grupo III – GIII). A hipernocicepção mecânica foi induzida pela injeção intraplantar de carragenina e avaliada com o emprego de um analgesímetro digital durante um período de 4 horas. Para estudo da neurotoxicidade, os animais foram diariamente avaliados quanto ao peso corporal, alterações comportamentais e funções neurológicas, sendo mortos por perfusão transcardíaca um, sete ou 14 dias após a implantação da cânula SA. A ME foi coletada e submetida à análise histopatológica. Os resultados demonstraram que a administração do meloxicam na dose de 30µg.animal^{-1} não foi capaz de suprimir a resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela carragenina. Nenhum animal, contudo, apresentou qualquer alteração comportamental ou das funções neurológicas durante o período de observação, tampouco ocorrendo diferença na variação do peso corporal entre os grupos. A análise histopatológica da ME não apresentou diferenças entre os grupos experimentais, entretanto revelou a presença de alterações severas relacionadas à presença da cânula SA, especialmente na região cervical. Estes dados sugerem a ausência de efeitos neurotóxicos após a administração SA do meloxicam, encorajando a realização de estudos adicionais com modelos de dor ou doses distintas.

Palavras-chave: AINE, carragenina, dor, medula espinhal

ABSTRACT

Evidences show that both isoforms of cyclooxygenase (COX) are constitutively expressed in the spinal cord (SC) of rats; COX-2 is predominant in the spinal cord dorsal horn (SCDH) and capable of having an important role in the development and maintenance of inflammatory pain. Thus, it is suggested that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) may exercise their analgesic action directly on central nervous system (CNS), and spinal administration of these drugs has emerged as an alternative in pain management. This study aims therefore to assess the effects of subarachnoid administration (SA) of meloxicam in a model of inflammatory pain as well as its possible toxicity on the CNS. Twenty-seven Wistar male rats were used, in which a SA catheter was implanted. The animals were randomly distributed in three groups and submitted to administration of 5µL of saline (Group I-GI), 30µg of meloxicam (Group II-GII) or only to chronic maintenance of SA catheter (Group III-GIII). The mechanical hypernociception was induced by intraplantar injection of carrageenan and assessed with the use of a digital analgesymeter during a period of four hours. To study the neurotoxicity, the animals were assessed daily for body weight, behavioral changes and neurological functions, being euthanized by transcardiac perfusion in one, seven or fourteen days after implantation of SA catheter. The SC was collected and submitted to histopathologic analysis. Results showed that the administration of meloxicam in the 30µg.animal^{-1} dose was not capable of suppressing hypernociceptive mechanical response induced by carrageenan. No animal, however, exhibited any changes in behavior or neurological functions during the observation period, neither difference in body weight variation among groups. Histopathologic analysis of SC did not show differences among the experimental groups, but revealed the presence of severe alterations related to the presence of SA catheter, especially in the cervical. These data suggest the absence of neurotoxic effects after SA administration of meloxicam, encouraging further studies in pain models or different doses.

Keywords: *NSAID, carrageenan, pain, spinal cord*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Anatomia do canal vertebral e da medula espinhal.....	21
FIGURA 2	Mecanismo de dor.....	30
FIGURA 3	Produção e ação das prostaglandinas.....	33
FIGURA 4	Representação da fórmula química do meloxicam.....	36
FIGURA 5	Procedimentos de implantação da cânula SA.....	46
FIGURA 6	Procedimentos de avaliação da hipernocicepção mecânica.....	48
FIGURA 7	Procedimentos de eutanásia e coleta de material.....	50
FIGURA 8	Presença de alteração neurológica em rato submetido à implantação da cânula subaracnóidea.....	55
FIGURA 9	Distribuição dos animais experimentais submetidos à implantação de cânula subaracnóidea, de acordo com a presença e etiologia de alterações que implicassem na exclusão do estudo.	56
FIGURA 10	Valores médios do Δ do limiar de retirada ± desvio padrão (g) nos diferentes momentos de avaliação da hipernocicepção mecânica em ratos submetidos à administração SA de solução salina (GI) ou meloxicam (GII).....	57
FIGURA 11	Urina com coloração avermelhada em animal que recebeu implantação de cânula SA, sugerindo a ocorrência de hematúria.	59
FIGURA 12	Alterações histológicas da medula espinhal de ratos submetidos à injeção de solução salina, meloxicam ou somente manutenção crônica da cânula SA.....	63
FIGURA 13	Média e erro padrão do peso corporal (g) de animais submetidos à administração de solução salina (GI), meloxicam (GII) ou somente implantação de cânula SA (GIII) em 0 (basal), 7 e 14 dias de avaliação. *$p < 0,05$.....	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Diferença média, erro padrão e valor de p do Δ do limiar de retirada (g) nos ratos dos grupos GI e GII, no diferentes momentos de avaliação da hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina..... 57

TABELA 2 Valores médios dos escores de avaliação neurológica e número absoluto de animais apresentando sugerida hematúria nos diferentes grupos de ratos submetidos à administração de solução salina (GI) ou meloxicam (GII), ou somente implantação de cânula SA (GIII)..... 59

TABELA 3 Grau de lesão nos diferentes segmentos medulares e resultados dos testes de comparação entre os grupos de ratos submetidos à administração de solução salina (GI), meloxicam (GII) ou à implantação de cânula SA (GIII)..... 60

TABELA 4 Número de lesões leves, moderadas ou severas e resultados dos testes de comparação entre os grupos de ratos submetidos à administração de solução salina (GI), meloxicam (GII) ou somente implantação de cânula SA (GIII)..... 61

TABELA 5 Presença de lesões severas em cada segmento medular e resultados dos testes de associação em ratos submetidos à administração de solução salina (GI), meloxicam (GII) ou à implantação de cânula SA (GIII)..... 61

TABELA 6 Presença de lesões de qualquer severidade em cada segmento medular e resultados dos testes de associação entre os grupos de ratos submetidos à administração de solução salina (GI), meloxicam (GII), ou somente implantação de cânula SA (GIII)..... 62

TABELA 7 Descrição do escore de lesão medular total (LMT) segundo os diferentes grupos e dias de eutanásia, e resultado das comparações..... 64

TABELA 8 Descrição do grau de severidade da lesão e resultados das comparações entre cada segmento medular dos animais de todos os

grupos experimentais..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UEA – Unidade de Experimentação Animal

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

COX – ciclooxigenase

ME – medula espinhal

CDME – corno dorsal da medula espinhal

AINEs – antiinflamatórios não-esteroidais

SNC – sistema nervoso central

SA – subaracnóide(a)

DM – dura-máter

LCR – líquido cefalorraquidiano

IASP – *International Association for the Study of Pain*

PG – prostaglandina

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

ATP – trifosfato de adenosina

NO – óxido nítrico

pH – potencial hidrogeniônico

IL – interleucina

IV – intravenosa

ICON – *Interagency Committee on Neurotoxicology*

IP – intraperitoneal

LMT – escore de lesão medular total

$PaCO_2$ – pressão parcial de dióxido de carbono

PaO_2 – pressão parcial de oxigênio arterial

NMDA – N-metil-D-aspartato

PESS – potenciais evocados somatosensoriais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 OBJETIVOS 18
2.1 Objetivo Geral 18
2.2 Objetivos Específicos 18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
3.1 Aspectos Anátomo-funcionais do Sistema Nervoso Central 19
3.1.1 Medula espinhal 19
3.1.2 Meninges espinhais 20
3.1.3 Dinâmica da administração subaracnóidea 23
3.2 Conceitos Gerais do Processo Doloroso 24
3.2.1 Fisiopatologia da dor aguda 25
3.2.1.1 Transdução 26
3.2.1.2 Transmissão 28
3.2.1.3 Percepção 31
3.2.1.4 Modulação 31
3.2.2 Ação das ciclooxigenases na nocicepção 32
3.3 Inibidores da Ciclooxigenase 35
3.3.1 Meloxicam 36
3.3.2 Efeitos antinociceptivos espinhais 37
3.3 Modelo de Dor Inflamatória Induzida pela Carragenina 40
3.4 Neurotoxicidade dos Fármacos Espinhais 40
4 MATERIAL E MÉTODOS 43
4.1 Animais 43
4.2 Grupos Experimentais 43
4.3 Fármacos 44
4.4 Implantação da Cânula Subaracnóidea 44
4.5 Procedimentos Pós-operatórios 47
4.6 Teste da Hiperalgesia Mecânica Induzida pela Carragenina 47
4.7 Eutanásia e Coleta de Material 49
4.8 Avaliação da Neurotoxicidade 51
4.8.1 Avaliação da função clínica neurológica 51

4.8.2 Avaliação da variação do peso corporal..... 51
4.8.3 Avaliação histopatológica da medula espinhal..... 52
4.9 Análise Estatística..... 52
5 RESULTADOS..... 54
5.1 Modelo Animal..... 54
5.2 Procedimento Anestésico..... 54
5.3 Implantação da Cânula Subaracnóidea..... 54
5.4 Avaliação da Atividade Antinociceptiva..... 56
5.4.1 Efeitos do meloxicam SA sobre a hipernocicepção inflamatória induzida pela carragenina..... 56
5.5 Avaliação da Neurotoxicidade..... 58
5.5.1 Efeitos do meloxicam SA sobre a função clínica neurológica..... 58
5.5.2 Efeitos do meloxicam SA sobre as características histopatológicas da medula espinhal..... 60
5.5.3 Efeitos do meloxicam SA sobre a variação do peso corporal..... 64
6 DISCUSSÃO..... 66
7 CONCLUSÕES..... 80
8 REFERÊNCIAS..... 81
ANEXO 1 - Carta de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais..... 95
APÊNDICE A - Ficha de avaliação neurológica..... 96
APÊNDICE B - Valores do Δ do limiar de retirada nos momentos de avaliação. 97
APÊNDICE C - Peso corporal dos animais experimentais nos momentos de avaliação..... 98

1 INTRODUÇÃO

A despeito de seu caráter primordialmente protetor, a dor é uma sensação aflitiva de repercussões fisiológicas e emocionais que representam um dos grandes males da humanidade moderna, cuja expectativa de vida vem se elevando gradualmente. Durante muitos anos, todavia, a dor foi considerada uma resposta sensorial inerente à lesão tecidual, de modo que as demais dimensões da experiência dolorosa – afetiva, cognitiva e psicológica, por exemplo – sempre foram subestimadas. Entretanto, ao longo do tempo, grandes avanços foram feitos no que se refere à compreensão dos mecanismos subjacentes à dor, de modo que a importância dos fatores externos ao organismo tem sido elucidada. Por sua natureza complexa, inespecífica e multifatorial, contudo, a identificação e o correto tratamento dos processos dolorosos seguem sendo grandes desafios, gerando diversas pesquisas e movendo a gigantesca indústria farmacêutica mundial.

No que se refere à dor aguda, existe primariamente uma clara função de alerta e defesa, sendo que em geral, ela possui breve duração e uma relação causa-efeito bem determinada. Porém, quando não tratados, os processos dolorosos agudos resultam em alterações fisiológicas que envolvem variados sistemas do organismo e podem ser gravemente deletérias. A dor crônica, por sua vez, resulta em estresse físico, emocional, econômico e social, sendo gradativamente incapacitante. Em grande parte, está associada à alteração dos mecanismos centrais de percepção da dor, com progressiva hipersensibilidade, sendo muitas vezes oriunda de um processo agudo cujo tratamento foi negligenciado. É nítida, portanto, a fundamental necessidade de que todos os meios disponíveis para controle da dor, tanto aguda, quanto crônica, sejam sempre empregados.

Apesar dos fármacos opióides serem até o presente momento a classe de analgésicos mais amplamente utilizada no tratamento de dores moderadas a severas, tanto no homem quanto nos animais, seu uso não está desprovido de efeitos colaterais indesejáveis. Esses efeitos podem, em maior ou menor escala, interferir no bem-estar e, consequentemente, na qualidade da recuperação do paciente, de modo que alternativas à administração sistêmica dos opióides vêm surgindo ao longo dos anos, com o intuito de se reduzir sua incidência e severidade. Essas alternativas preconizam tanto o emprego

de vias quanto de fármacos que possam vir a substituir o uso sistêmico dos opióides, mas, ao mesmo tempo, proporcionar similar grau de analgesia.

Dentre as diferentes propostas analgésicas sugeridas em substituição aos opióides sistêmicos, a utilização das vias espinhais – epidural e subaracnóidea – emergiu como uma alternativa promissora. Assim, na medida em que as pesquisas demonstraram estar a administração espinhal de fármacos associada à obtenção de analgesia similar, mas com o emprego de doses inferiores, encontrou-se a chave para a redução dos efeitos colaterais indesejáveis, em sua maioria dose-dependentes.

Embora a administração de opióides pelas vias espinhais tenha sido prontamente difundida como método eficaz de controle da dor, sua descoberta serviu como fator propulsor pela busca de novas propostas farmacológicas que envolvessem o uso similar de outras substâncias. A utilização de outros fármacos preconiza uma redução ainda mais acentuada dos efeitos indesejáveis que ocorrem – ainda que com menor severidade – mesmo com o uso espinhal dos opióides.

Nesse contexto, os AINEs despontaram como uma alternativa promissora, tendo sido motivo de diversos estudos nos últimos anos, visto que demonstram proporcionar analgesia com reduzidos efeitos indesejáveis. A descoberta de ações centrais específicas dos AINEs sobre a ME, adicionalmente aos seus efeitos periféricos, veio agregar fundamental importância às pesquisas que abordam sua eficácia e segurança.

Estudos que avaliem o uso espinhal de AINEs são, contudo, ainda limitados e em sua maioria empregam fármacos sem seletividade específica pelas isoenzimas da cascata inflamatória. Concomitantemente, apesar de esses trabalhos utilizarem modelos animais de dor induzida, são escassos aqueles que abordam os efeitos dos fármacos sobre a dor inflamatória através da avaliação objetiva da nocicepção mecânica.

É de fundamental importância, adicionalmente, abordar a possível toxicidade de qualquer substância quando administrada em contato direto com o SNC, uma vez que diferentes fármacos possuem diferentes ações a nível celular, as quais podem vir a comprometer a integridade do cordão espinhal. Dessa forma, estudos de neurotoxicidade que avaliem a segurança do fármaco em relação ao SNC são imprescindíveis no transcorrer do longo processo de pesquisas que precede a aplicação de um composto na rotina clínica.

Considerando a importância de tais avaliações e dada à escassez de informações existentes até o momento, se propôs neste estudo avaliar os possíveis efeitos antinociceptivos mecânicos e neurotóxicos de um antiinflamatório não-esteroidal, o

meloxicam, quando administrado de forma aguda por via subaracnóidea em um modelo animal de dor inflamatória.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito antinociceptivo mecânico e a neurotoxicidade do meloxicam administrado por via subaracnóidea, utilizando um modelo de nocicepção e inflamação aguda em ratos Wistar.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da administração subaracnóidea do meloxicam sobre a hipernocicepção mecânica aguda induzida pela carragenina.

- Investigar a ocorrência de sinais clínicos neurológicos indicativos de neurotoxicidade após a administração do fármaco.

- Comparar as variações no ganho de peso entre os diferentes grupos, estudando sua associação com possíveis sinais de neurotoxicidade.

- Investigar a ocorrência de lesões histopatológicas da medula espinhal indicativas de toxicidade por ação do fármaco.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos Anátomo-funcionais do Sistema Nervoso Central

Embora sigam os princípios celulares e moleculares fundamentais, os neurônios são células diferenciadas em relação às demais devido à sua habilidade única de receber, integrar, armazenar e enviar informações. Assim, uma vez que os sinais recebidos tanto do ambiente interno quanto do externo tenham sido processados pelos neurônios, gera-se uma resposta que pode ser comunicada a outros neurônios e tecidos, garantindo a rápida adaptação a alterações e com isso a sobrevivência do organismo (COHEN & PFAFF, 2008).

Constituído por até aproximadamente um trilhão de neurônios com um imenso número de interconexões, o sistema nervoso forma o complexo mecanismo de comunicação neuronal do organismo. Nele, cérebro e medula espinhal são constituídos por substância branca e cinzenta sem interposição de tecido conjuntivo, formando o sistema nervoso central (GARTNER & HIATT, 2003).

3.1.1 Medula espinhal

A medula espinhal é a região do SNC caudal ao cérebro, estando contida no canal vertebral. Sua porção cranial é contínua com a medula oblonga do cérebro ao nível do forame magno do crânio, enquanto sua região caudal final varia em relação à última vértebra lombar e o sacromédio nas diferentes espécies (DELLMANN & McCLURE, 1986). Durante o desenvolvimento embrionário, a ME se estende ao longo de todo o comprimento da coluna vertebral, contudo ocorre o subsequente crescimento diferenciado da coluna vertebral em relação à ME, de modo que o comprimento da coluna passa a ser superior ao da medula antes mesmo do nascimento do animal (NEWTON, 2008). Assim, os ramos nervosos são obrigados a um curso caudal ao longo da medula, aumentando o intervalo entre a origem do nervo espinhal e seu forame intervertebral (DELLMANN & McCLURE, 1986).

Um corte seccional da ME apresenta tamanho e forma variados nos diferentes níveis do canal vertebral. Os três últimos segmentos lombares e os primeiros dois ou três segmentos sacrais são largos em diâmetro, formando o chamado alargamento lombar (*intumescentia lumbalis*). Esse alargamento ocorre como resposta ao aumento

do número de células nervosas e fibras na região, as quais estão associadas ao plexo lombossacral e aos músculos do membro pélvico (DELLMANN & McCLURE, 1986).

Cada segmento da ME encontra-se associado a um par de nervos espinhais que se originam de uma série de pequenas raízes, sendo cada nervo formado por fibras das raízes dorsal e ventral. Enquanto a raiz dorsal é constituída por axônios sensoriais cujos corpos celulares residem no gânglio da raiz dorsal, localizado fora do SNC, a raiz ventral é formada pelos axônios de neurônios motores do corno ventral da substância cinzenta espinhal (NEWTON, 2008).

Em sua estrutura interna, a ME é dividida em uma camada exterior composta por substância branca e uma porção central constituída por substância cinzenta. A substância branca é formada por tratos de fibras mielinizadas sensoriais e motoras, que ascendem e descendem longitudinalmente ao longo da extensão da ME. A substância cinzenta, por sua vez, toma a forma de um "H", sendo composta por pares de cornos dorsais e ventrais que seguem o comprimento da medula. Os cornos dorsais possuem natureza sensorial e recebem informações somáticas e viscerais aferentes. Os cornos ventrais, por outro lado, possuem função motora e contêm os neurônios motores cujos axônios inervam a musculatura esquelética (NEWTON, 2008).

Com características morfologicamente heterogêneas, a substância cinzenta da ME possui células que diferem consideravelmente em tamanho, forma e densidade. Contudo, uma vez que apresenta certa organização intrínseca, zonas de regularidade, chamadas de lâminas, podem ser identificadas, tendo sido primeiramente descritas por Rexed no gato, em 1954. Desde então, o conceito de lâminas tem sido amplamente adotado a fim de descrever os limites citoarquitetônicos da ME em muitas espécies. No entanto o exame detalhado e a descrição de tais estruturas foi completada somente no camundongo (SIDMAN et al., 1971), no rato (MOLANDER et al., 1984) e no homem (SCHOENEN & FAULL, 2004), adicionalmente ao trabalho original de Rexed (1954) no gato. Todavia, no geral a organização das lâminas de Rexed nos mamíferos é similar, sendo em número de 10 e estruturadas em uma série de camadas seguindo o sentido dorso-ventral (HEISE & KAYALIOGLU, 2008).

3.1.2 Meninges espinhais

As meninges são membranas fibrosas que envolvem e protegem o cérebro e a ME, sendo em número de três: dura-máter (DM), aracnóide e pia-máter. Por sua

natureza fortemente fibrosa, a DM é muitas vezes referida como paquimeninge, enquanto que a aracnóide e a pia-máter são conectadas, e juntas são chamadas de leptomeninge, devido à sua fina e delicada natureza (DELLMANN & McCLURE, 1986). A Figura 1 ilustra as diferentes estruturas que compõem a medula espinhal e seus envoltórios.

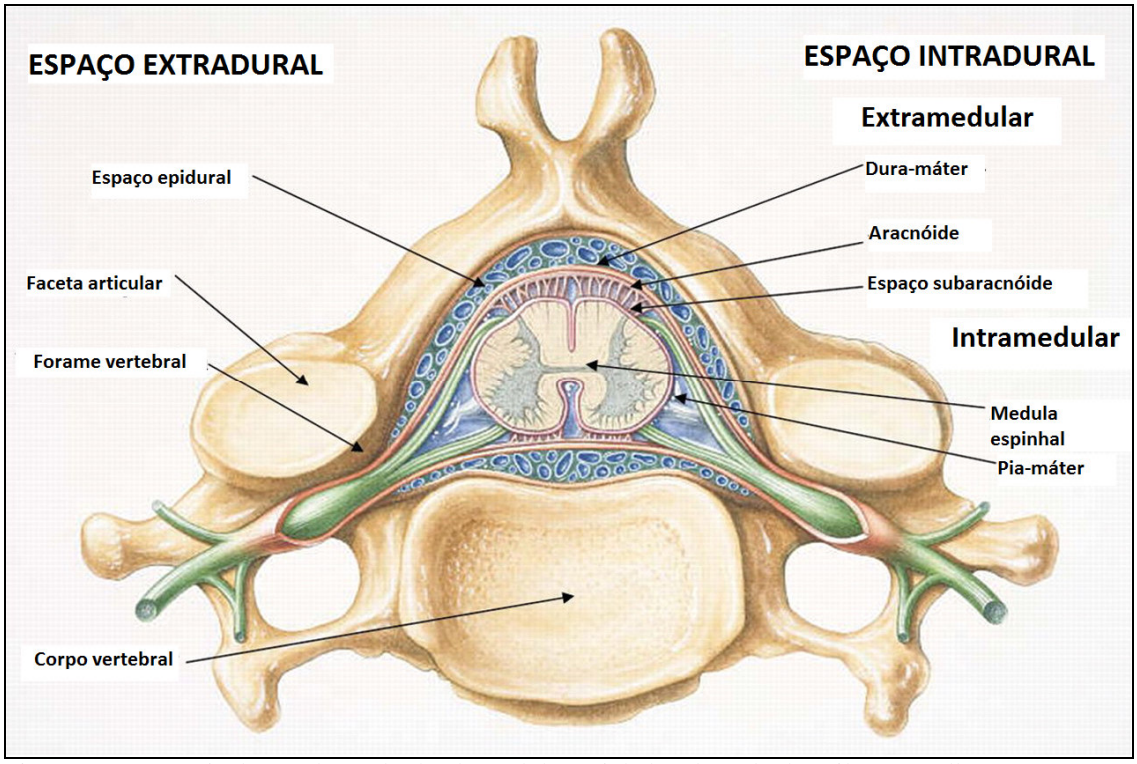

Figura 1 – Anatomia do canal vertebral e da medula espinhal. Adaptado de Wilne & Walker, 2010.

A DM espinhal é a mais superficial das membranas (NEWTON, 2008). Em sua formação, fibras colágenas e poucas fibras elásticas distribuem-se em um arranjo multidirecional, acelular exceto por uma camada de células adjacente à membrana aracnóide (CHAVES & GUSMAN, 2004). Expansões laterais cobrem os ramos dos nervos espinhais, acompanhando-os nos forames intervertebrais. Assim, visto que o nervo espinhal é formado pela união dos ramos dorsal e ventral, a DM forma uma bainha única, contínua com o epineuro do nervo espinhal (NEWTON, 2008).

Diferentemente da sua porção craniana, em que se apresenta constituída por duas lâminas adjacentes (craniana e meningeal), a DM espinhal é formada por apenas uma camada, contínua com a DM meningeal do cérebro (GOSHGARIAN, 2003).

Entre o periósteo e a DM, uma pequena cavidade contendo gordura, tecido areolar (conjuntivo) e o plexo venoso vertebral interno constitui o chamado espaço

epidural (GOSHGARIAN, 2003). De acordo com Newton (2008), a gordura epidural fornece proteção à ME, enquanto as veias do plexo vertebral interno têm a função de drenar o sangue da ME até o plexo venoso vertebral externo, que é mais superficial.

A cavidade entre a DM e a aracnóide espinhais é chamada cavidade subdural, que contém uma quantidade muito pequena de fluido. No animal vivo a cavidade subdural é uma fenda capilar porque o líquido cefalorraquidiano (LCR) da cavidade SA pressiona a membrana aracnóide contra a superfície interna da DM (DELLMANN & McCLURE, 1986; NEWTON, 2008). Por essa razão, diversos autores referem-se a um espaço subdural "potencial", estando ele aumentado sob condições patológicas (GOSHGARIAN, 2003). No cadáver, adicionalmente, a pressão do LCR é perdida por difusão, e a cavidade subdural aparenta ser maior (DELLMANN & McCLURE, 1986; NEWTON, 2008).

A aracnóide espinhal é um tubo fino, quase transparente, que envolve a ME e, como a DM, possui extensões tubulares que recobrem os ramos dos nervos espinhais (DELLMANN & McCLURE, 1986) e que são contínuas com seu epineuro (GOSHGARIAN, 2003). Ininterrupta desde a aracnóide craniana, esta delicada membrana avascular recobre completamente o saco dural e a cauda equina, terminando na região sacral (GOSHGARIAN, 2003). É formada por uma fina rede de fibras de tecido conectivo que passa através do espaço SA, se estendendo até a superfície da ME e conectando-se à pia-mater (DELLMANN & McCLURE, 1986; NEWTON, 2008).

O espaço SA separa a aracnóide da membrana mais profunda, a pia-máter, sendo atravessada pelas trabéculas que conectam as duas membranas. Dentro do espaço SA, o LCR, produzido pelo plexo coróide do sistema ventricular, amortece os choques traumáticos sofridos pela ME, permitindo que ela flutue dentro da cavidade (DELLMANN & McCLURE, 1986; GOSHGARIAN, 2003; NEWTON, 2008). A cavidade SA é alargada na área da cauda equina, nas regiões caudais, lombar e sacral, formando a cisterna lombar (DELLMANN & McCLURE, 1986).

Por fim, a pia-máter é a membrana mais profunda e delicada dentre as meninges, estando aderida à superfície da ME, seguindo exatamente o seu contorno (NEWTON, 2008). É uma lâmina altamente vascularizada, sendo contígua com a membrana neuroglial da ME (DELLMANN & McCLURE, 1986). A pia-máter recobre diretamente os vasos sanguíneos e as raízes dos nervos espinhais e, na região final da coluna, colabora na formação do ligamento coccígeo, responsável por centralizar e

ancorar a ME, mantendo seu posicionamento e prevenindo lesões (GOSHGARIAN, 2003).

3.1.3 Dinâmica da administração subaracnóidea

O LCR do canal vertebral ocupa o estreito espaço que envolve a ME e a cauda equina, estando circundado pela membrana aracnóide. É um fluido isotônico, aquoso, com uma constituição semelhante à do líquido intersticial e densidade média de $1.003 g.L^{-1}$ a 37ºC (HOCKING & WILDSMITH, 2004). Embora as vias exatas através das quais se dá o fluxo do LCR ainda careçam de elucidação, sabe-se que o LCR secretado pelo plexo coróide descende pelo neuroeixo até o quarto ventrículo, e deste segue através do forame magno até a cisterna magna e o espaço SA na região basal (JOHANSON et al., 2008).

Uma vez administrado no espaço SA, um fármaco se difunde ao longo do LCR, e sua distribuição varia de acordo com a lipossolubilidade individual da substância (RATHMELL et al., 2005). Seguindo o modelo multicompartimental proposto por Ummenhofer et al. (2000) em um estudo com opióides, o destino de um fármaco administrado por via SA é complexo. Simultaneamente, a substância: a) ascende cranialmente ao longo do LCR; b) penetra na ME; e 3) atravessa a DM, chegando ao espaço epidural, onde se liga à gordura. A partir da ME e do espaço epidural, o fármaco alcança o compartimento plasmático, por captação vascular. As propriedades clínicas de cada substância (período de latência, duração da ação) e o grau de difusão cranial resultam da soma dos efeitos de cada uma dessas rotas (RATHMELL et al., 2005).

Fármacos lipofílicos rapidamente cruzam a DM, onde são sequestrados na gordura ou penetram na ME, sendo levados ao plasma a partir destes sítios. Como resultado da alta lipossolubilidade, são fármacos que apresentam curto período de latência, limitada difusão cranial e uma duração de ação relativamente curta. Em contraste, substâncias hidrofílicas cruzam a DM lentamente, se ligam pouco à gordura epidural e alcançam o plasma vagarosamente. O resultado desta transferência lenta e limitada da substância para o plasma é a sua permanência em concentrações relativamente altas no LCR. Assim, são fármacos que apresentam grande período de latência, extensa difusão cranial e longa ação (RATHMELL et al., 2005).

3.2 Conceitos Gerais do Processo Doloroso

Em 1986, após sucessivas tentativas, a *International Association for the Study of Pain* (IASP) definiu a dor como "uma experiência sensorial e emocional desagradável, que é associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões" (MENEZES, 2004). A dor, portanto, é uma experiência complexa que envolve não somente a transdução de um estímulo ambiental nocivo como também seu processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Por sua natureza inerentemente aversiva, a dor e seu tratamento têm sido objetos de interesse desde períodos anteriores às mais antigas escrituras humanas até o momento conhecidas. Tábuas da civilização Babilônica datadas de 2.250 a.C. relatam o uso de ervas em restaurações dentárias para alívio da dor. Hipócrates, por sua vez, em 500 a.C., foi responsável pelas primeiras descrições do emprego do ópio, substância essa que, juntamente com os anestésicos locais e gerais, serviu como base para nosso atual conhecimento acerca das vias da dor (PLEUVRY & LAURETTI, 1996).

As últimas décadas têm sido de significativos avanços científicos no que concerne ao conhecimento da fisiologia, fisiopatologia e farmacologia da dor (KELLY et al., 2001). Esse rápido progresso pode ser atribuído, em grande parte, à adoção de uma abordagem multidisciplinar, envolvendo o uso simultâneo de sistemas neurobiológicos, análises de comportamento, genética, e técnicas celulares e moleculares (HUNT & MANTYH, 2001).

Apesar de existir uma tendência a se imaginar a dor com uma entidade sensorial homogênea, ela existe como diferentes tipos: nociceptiva, inflamatória, neuropática e funcional. A dor nociceptiva é uma sensação fisiológica vital, com a função de proteção. Contudo, se um dano tecidual vem a ocorrer a despeito do sistema defensivo nociceptivo, torna-se imperativo que o corpo priorize a promoção da cura do tecido lesionado em detrimento à proteção contra os estímulos nocivos. A dor inflamatória surge de forma complementar a esse objetivo. Nesse estado, a sensibilidade no local afetado é aumentada, de modo que estímulos que antes não provocariam dor, agora provocam. Como resultado, há a tendência de se prevenir o contato ou movimentação do tecido lesionado, minimizando danos adicionais até que o processo de reparo esteja finalizado. Assim, a dor inflamatória tipicamente se reduz conforme a lesão e a resposta inflamatória também diminuem. A dor pode ser ainda, oriunda da lesão ou disfunção de

um nervo (dor neuropática) ou da atividade anormal do sistema nervoso (dor funcional) (WOOLF, 2004).

3.2.1 Fisiopatologia da dor aguda

A experiência sensorial da dor aguda causada por um estímulo nocivo é mediada por um sistema sensorial especializado de alto limiar, o sistema nociceptivo. Esse sistema se estende desde a periferia, passando através da ME, tronco cerebral e tálamo até o córtex cerebral, onde a sensação é percebida (WOOLF, 2004).

Em 1906, Sherrington propôs a existência do nociceptor, um neurônio sensorial primário que é ativado por estímulos capazes de causar dano tecidual. De acordo com esse modelo, nociceptores possuem limiares ou sensibilidades característicos que os distinguem de outras fibras nervosas sensoriais (JULIUS & BAUSBAUM, 2001). O termo nocicepção, por sua vez, foi introduzido por Sherrington com o intuito de diferenciar a percepção de estímulos nocivos da sensação de dor propriamente dita (DUBNER & BENNETT, 1983).

Nesse sentido, a dor é uma sensação complexa e, muitas vezes, subjetiva, incluindo componentes afetivos, culturais e psicológicos, enquanto que a nocicepção é caracterizada pela estimulação das fibras aferentes primárias que transmitem o impulso nociceptivo até o SNC (DUBNER & BENNETT, 1983). Por conseguinte, nem todo estímulo nocivo que ativa os nociceptores deflagra necessariamente uma experiência de dor, bem como a experiência dolorosa não possui obrigatoriamente uma correlação proporcional à atividade dos nociceptores (BASBAUM & JESSEL, 2000).

Essa relação entre a percepção da dor e a estimulação dos nociceptores envolve, dessa forma, um processamento pelas vias sensoriais que ocorre de maneira complexa, de modo que esta natureza altamente subjetiva da dor é um dos fatores que mais dificulta sua compreensão e tratamento clínico (BASBAUM & JESSEL, 2000).

No que se refere ao emprego de animais como modelos experimentais de dor, é mais adequada a utilização do termo nocicepção, visto serem eles incapazes de verbalizar os componentes subjetivos da experiência dolorosa. Assim, tem sido proposto que termos como dor e analgesia sejam mais apropriadamente empregados para seres humanos, enquanto nocicepção e antinocicepção sejam mais adequados para animais (JONES, 1992; KLAUMANN et al., 2008). Todavia, por convenção, o termo

"dor" é usualmente empregado tanto para pacientes humanos quanto animais (HELLEBREKERS, 2002).

O componente fisiológico da dor, ou seja, a nocicepção compreende os processos de transdução, transmissão, percepção e modulação dos sinais neurais gerados em resposta ao estímulo nocivo. De forma simplificada, é um sistema que pode ser considerado como uma cadeia de três neurônios: o neurônio de primeira ordem se origina na periferia e se projeta para a ME; o neurônio de segunda ordem ascende pela ME; e o neurônio de terceira ordem projeta-se para o córtex cerebral (MESSLINGER, 1997; TRANQUILLI, 2004). A Figura 2 ilustra esse mecanismo.

3.2.1.1 Transdução

O ponto inicial da sequência de eventos que desencadeia o fenômeno sensitivo-doloroso é a transformação dos estímulos ambientais físicos ou químicos intensos em potenciais de ação, que das fibras nervosas periféricas são transferidos para o SNC (TEIXEIRA, 2001).

A percepção da dor inicia-se na periferia pela ativação dos nociceptores, a qual ocorre por diferentes fatores: estímulo por substâncias algiogênicas, liberadas pelas células dos tecidos lesados ou inflamatórias – mastócitos, macrófagos e linfócitos – em situações de trauma, isquemia ou inflamação; liberação retrógrada de neurotransmissores pelas fibras nervosas; e influências noradrenérgicas, procedentes de eferências simpáticas, resultando em atividade generalizada das fibras nervosas envolvidas (MENEZES, 2004).

De forma geral, os canais iônicos transdutores são de cálcio ou sódio, e não são controlados por voltagem, mas por temperatura, substâncias químicas ou forças mecânicas. Uma vez ativados, os canais se abrem, permitindo o influxo de sódio e cálcio no terminal do nociceptor periférico, produzindo, dessa forma, uma corrente que despolariza a membrana (WOOLF, 2004).

Segundo Costigan & Woolf (2000), as fibras aferentes de primeira ordem podem ser classificadas de acordo com sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução. As fibras Aβ são mielinizadas, com diâmetro maior que 10µm e velocidade de condução de 30-100m.s^{-1}. As fibras aferentes Aδ, por sua vez, são pouco mielinizadas, variando em seu diâmetro entre 2,0-6,0µm e têm velocidade de transmissão de 12-30m.s^{-1}. Fibras não-mielinizadas do tipo C possuem diâmetro entre 0,4-1,2µm e mostram uma

velocidade de condução de 0,5-2,0m.s^{-1}. As fibras sensoriais mielinizadas de rápida condução do tipo Aβ detectam estímulos inócuos aplicados a pele, músculos e articulações, não contribuindo, assim, para a nocicepção.

As terminações nervosas das fibras C e Aδ encontram-se presentes em estruturas superficiais do tegumento, parede das vísceras e dos vasos sanguíneos, bem como no sistema músculo-esquelético. As fibras C são responsáveis por cerca de 70 a 80% das aferências sensitivas, constituindo o principal grupo, no que se refere à nocicepção. Enquanto seus receptores são polimodais e respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, os receptores das fibras Aδ são de diferentes tipos: multimodais (com propriedades semelhantes às das fibras C, diferindo apenas na velocidade da condução); mecanorreceptores (presentes somente na pele); e termorreceptores (MENEZES, 2004). Desse modo, estímulos nocivos que resultam em uma sensação de dor rápida, fina e bem localizada refletem, no geral, a ação de fibras Aδ – responsável pela chamada dor primária – enquanto que a nocicepção difusa e lenta, em queimação, é elicitada pelas fibras C (dor secundária) (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Múltiplas classes de fibras Aδ e C existem, contudo sua caracterização e descrição são dificultadas por diversos fatores, incluindo inconsistências terminológicas, diferenças entre espécies, propriedades contrastantes das fibras entre os vários tecidos, e os métodos empregados na sua detecção (MILLAN, 1999).

Por conseguinte, o perfil de ativação dos receptores é amplamente derivado da análise das fibras responsáveis pela inervação da pele, e qualidades bastante diversas caracterizam os nociceptores em outros tecidos (RAJA et al., 1999). Nos aferentes corneais, por exemplo, a dor geralmente é produzida pela estimulação tátil inócua, embora os receptores possam ser sensibilizados por mediadores inflamatórios (GEBHART, 1996). É clara, portanto, a dificuldade que surge em se definir um nociceptor com base apenas no seu limiar de ativação ou nas situações em que sua atividade provoca dor (JULIUS & BASBAUM, 2001).

Uma vez liberada, a energia química, mecânica ou térmica é convertida pelos nociceptores em impulsos neurais, em um processo conhecido como transdução. Quando as fibras C e Aδ são ativadas por estímulos breves e intensos, acompanhados de pouco dano tecidual, o resultado é uma dor transitória que serve como um sinal fisiológico de alerta. Todavia, se a ativação dos nociceptores for acompanhada por dano tecidual ou infecção, uma resposta de lesão regional ocorre na periferia. Substâncias químicas e enzimas são liberadas pelos tecidos afetados, aumentando a transdução do

estímulo doloroso (KELLY et al., 2001). Bradicininas, acetilcolina, prostaglandinas (PGs), histamina, serotonina, leucotrienos, substância P, tromboxano, fator de ativação plaquetária, radicais ácidos, íons potássio e citocinas são algumas destas substâncias até o momento identificadas que, em contato com os nociceptores, reduzem seu limiar aos estímulos nociceptivos nos locais de liberação (MENEZES, 2004). Adicionalmente, as células lesadas liberam enzimas em seu interior que, através da ativação de diferentes substâncias, levam a uma intensa dilatação arteriolar e ao aumento da permeabilidade capilar, contribuindo para que o processo inflamatório se perpetue (GUYTON & HALL, 2002).

Como resultado da liberação destes fatores químicos e sensibilização dos nociceptores, estímulos de baixa intensidade passam a ser interpretados como dolorosos. Esta série de eventos que se segue a uma lesão tecidual é conhecida como sensibilização periférica e se caracteriza pelo aumento da atividade espontânea neuronal, diminuição do limiar de ativação dos nociceptores e aumento da resposta a estímulos supraliminares (GOZZANI, 2004). Um tipo particular de nociceptor é referido como nociceptor “silencioso” ou “adormecido”, o qual só é ativado após inflamação ou lesão tecidual. Esses receptores, previamente silenciosos, entram em atividade após estímulos térmicos e mecânicos, mas somente depois da liberação dos produtos químicos resultantes da lesão (WOOLF & CHONG, 1993; JULIUS & BASBAUM, 2001). Como consequência, desenvolvem descargas espontâneas e tornam-se capazes de responder intensamente a estímulos nociceptivos e não-nociceptivos. Estima-se que 40% das fibras C e 30% das fibras Aδ atuem como receptores silenciosos (WOOLF & CHONG, 1993).

O resultado final da sensibilização dos nociceptores (sensibilização periférica) é o aparecimento de hiperalgesia, ou seja, uma resposta exagerada aos estímulos dolorosos (GOZZANI, 2004).

3.2.1.2 Transmissão

Uma vez ocorrido o mecanismo de transdução, os impulsos são levados via fibras Aδ e C ao CDME ou ao núcleo trigeminal espinhal (no caso da dor orofacial), onde as fibras fazem sinapse com neurônios na substância cinzenta, processo esse denominado de transmissão (JULIUS & BASBAUM, 2001; KELLY et al., 2001). Os nociceptores chegam ao CDME de maneira altamente organizada, de forma que as

sinapses ocorrem nas camadas superficiais das lâminas de Rexed: as fibras Aδ o fazem nas lâminas I, II e V, enquanto que as fibras C realizam sinapses nas lâminas I e II (KELLY et al., 2001).

As fibras aferentes de primeira ordem formam conexões com uma das três populações de neurônios do CDME: a) interneurônios, subdivididos em excitatórios ou inibitórios; b) neurônios proprioespinhais, que estendem-se por múltiplos segmentos espinhais e estão envolvidos com a atividade reflexa; c) neurônios de projeção, que participam da transmissão rostral do estímulo através da ME, até centros supraespinhais. Esses três componentes interagem e são essenciais para o processamento da informação nociceptiva, o que facilita a geração de uma resposta apropriada e organizada à dor (MILLAN, 1999).

De acordo com Millan (1999), as fibras aferentes nociceptivas sintetizam uma diversidade de substâncias potencialmente envolvidas na transmissão central e na modulação da informação. Essas incluem o glutamato e outros aminoácidos excitatórios; neuropeptídeos, como a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP); a fonte universal de energia celular, trifosfato de adenosina (ATP); o gás difusível, óxido nítrico (NO), os metabólitos fosfolipídicos, PGs e neurotrofinas.

O processo através do qual os neurônios do CDME se tornam sensibilizados por estímulos nocivos prévios é frequentemente referido como *wind-up* ou sensibilização central (GOTTSCHALK & SMITH, 2001; KELLY et al., 2001; WOOLF, 2004). Tal fenômeno implica alterações dos impulsos periféricos, com adaptações positivas ou negativas. Ocorre, assim, redução do limiar e aumento da resposta aos impulsos aferentes, descargas persistentes após estímulos repetidos e ampliação dos campos receptivos de neurônios do CDME (ROCHA et al., 2007).

Woolf (2004) afirmou que o aumento na excitabilidade celular significa sua ativação por estímulos que são normalmente sublimiares, e a geração de uma resposta exagerada aos estímulos supralimiares. O recrutamento de estímulos sublimiares se manifesta como uma redução no limiar para surgimento da dor (alodinia), uma resposta amplificada ao estímulo nocivo (hiperalgesia), e a expansão da sensibilidade a áreas não-lesadas (hiperalgesia secundária).

Segundo Melzack et al. (2001) diversos investigadores tem proposto teorias detalhadas acerca do modo pelo qual o estímulo nocivo produz alterações na função do SNC. Contrariando as teorias prévias de sensibilização central, tem se proposto que, adicionalmente ao papel da hiperatividade neuronal sobre a dor patológica, alterações

celulares e moleculares afetam a excitabilidade da membrana e induzem a expressão de novos genes, contribuindo, assim, para que futuras estimulações gerem respostas exacerbadas.

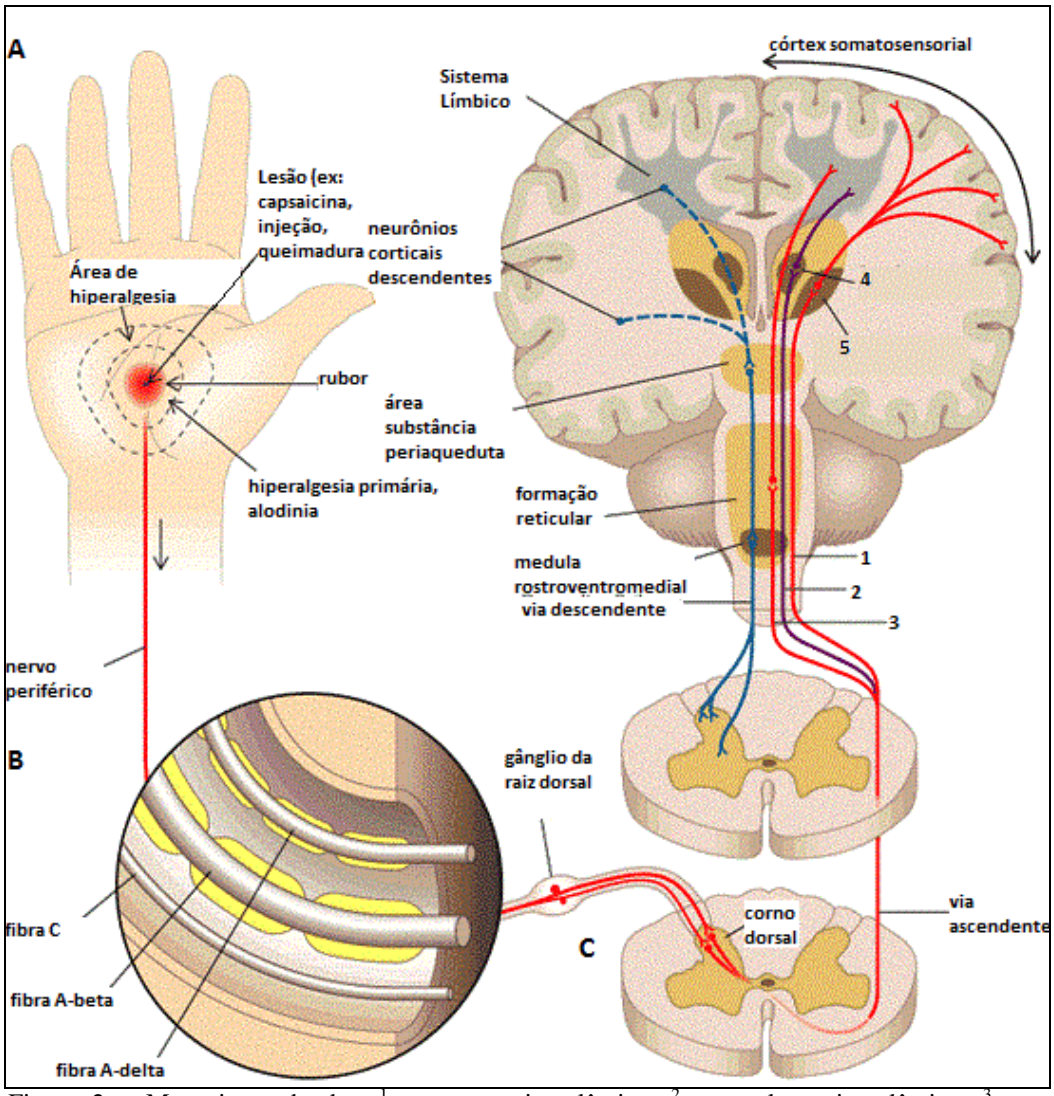

Figura 2 – Mecanismo de dor. [1]trato neoespinotalâmico; [2]trato paleoespinotalâmico; [3]trato espinoreticular; [4]núcleo talâmico intralaminar; [5]núcleo talâmico ventroposterolateral **A.** A estimulação das fibras C produz dor espontânea e hiperalgesia primária. Adicionalmente, uma área de alodinia e hiperalgesia secundária fora da região de lesão primária é produzida no SNC, como conseqüência do tráfego de impulsos aferentes nociceptivos. **B.** Quando ativados, os nociceptores conduzem os impulsos até a ME via fibras Aδ e C. Fibras Aβ podem se tornar sensibilizadas por mecanismos específicos do SNC para produzir alodinia. **C.** Quando áreas do tálamo e córtex cerebral são ativadas, projeções secundárias no trato espinotalâmico, no trato da coluna dorsal e outras vias nociceptivas levam à percepção consciente da dor. Adaptado de Galer et al., 2002.

3.2.1.3 Percepção

As fibras aferentes nociceptivas de segunda ordem – conhecidas como neurônios de projeção – têm seus corpos celulares no CDME, a partir do qual projetam axônios aos centros do SNC responsáveis pelo processamento da informação nociceptiva (KELLY et al., 2001).

A informação sobre o dano tecidual é conduzida pelos neurônios de projeção, os quais cruzam a linha média e, através de vias ascendentes que correm no lado oposto da medula, transmitem a informação ao tronco cerebral e tálamo. Estas fibras formam desse modo, o trato espinotalâmico, a maior via ascendente para informações de dor e temperatura (PURVES et al., 2001).

No caso das informações nociceptivas oriundas da face, contudo, uma rota diferenciada existe até o tálamo. Os axônios de primeira ordem se originam de células do gânglio trigeminal e dos gânglios associados a outros nervos cranianos e levam informações dos nociceptores faciais até o tronco cerebral. Essas fibras realizam um curso descendente até o bulbo, de onde partem neurônios de segunda ordem que levam a informação até o tálamo (PURVES et al., 2001).

Alcançando tais centros, interneurônios fazem a retransmissão das informações até o córtex cerebral (WOOLF, 2004). A ativação dessas estruturas supraespinhais é mediada por aminoácidos excitatórios (JENSEN & YAKSH, 1992), todavia os neurotransmissores envolvidos no processamento central da informação nociceptiva ainda não foram elucidados (KELLY et al., 2001).

Ploner et al. (2006) demonstraram que a velocidade de condução da informação dolorosa tanto na periferia quanto na ME é mais lenta do que a transmissão da informação tátil. Contudo o processamento cerebral da dor é substancialmente mais rápido do que o processamento da informação tátil, compensando a condução lenta da periferia e da ME. Como conseqüência há um curto período de latência estímulo-resposta, gerando uma resposta comportamental protetora imediata.

3.2.1.4 Modulação

Apesar de existirem evidências sobre a presença de mecanismos supressores desde o início do século XX, foi somente com a apresentação da teoria de comporta por Melzack & Wall, em 1965, que os sistemas modulatórios da dor passaram a ser

reconhecidos. De acordo com essa teoria, a supressão da dor decorreria da inibição pré-sináptica na ME, resultante da colisão entre potenciais dos aferentes primários e antidrômicos originados na substância gelatinosa do CDME. Embora atualmente ela não seja mais aceita da forma como foi apresentada, a teoria teve o mérito de inaugurar o conceito da interação sensorial, segundo o qual as diferentes modalidades e qualidades sensoriais interagem entre si, modificando-se quanto à sua expressão (WAISBROD et al., 1984).

De um modo geral, a existência de mecanismos endógenos que reduzem a dor através de uma rede de inibição é atualmente aceita (OSSIPOV et al., 2010), e as vias descendentes do tronco cerebral constituem um dos principais mecanismos de controle da transmissão da dor (MILLAN, 1999; REN & DUBNER, 2002).

No processo de modulação, estímulos se originam em múltiplas áreas, incluindo o hipotálamo, a amígdala e o córtex cingulado rostral anterior (OSSIPOV et al., 2010) e terminam em neurônios do CDME espinhal e do subnúcleo caudal do núcleo trigeminal. Assim, direta ou indiretamente, aumentam ou diminuem o tráfego de informações nociceptivas, alterando a experiência de dor (FIELDS et al., 2005). Peptídeos opióides, monoaminas, neurotensina e aminoácidos excitatórios têm sido os principais neurotransmissores implicados nesse processo (MENEZES, 2004).

Estes impulsos descendentes não somente influenciam a transmissão sináptica das fibras sensoriais no nível da primeira sinapse, no CDME, como também atuam no bulbo e diencéfalo, modulando a informação ascendente em cada nível do neuroeixo (BISHOP, 1980). Entretanto, as vias descendentes não exercem ações exclusivamente inibitórias no CDME. De fato, um único transmissor pode exercer múltiplas ações no corno dorsal, de acordo com o tipo de neurônio-alvo e o receptor ativado (MILLAN, 1999). Segundo Ren & Dubner (2002) a existência de vias descendentes facilitatórias fornece uma gama de sítios-alvo para o desenvolvimento de fármacos ou adjuvantes que possam potencializar os efeitos dos analgésicos já existentes.

3.2.2 Ação das ciclooxigenases na nocicepção

O processo de lesão e inflamação de um tecido resulta em profundas mudanças no ambiente químico do terminal periférico dos nociceptores. As células danificadas liberam seu conteúdo intracelular (como ATP e íons potássio); o pH se reduz; e citocinas, quimiocinas, e fatores de crescimento são produzidos pelas células

inflamatórias recrutadas ao sítio de lesão (LEVINE & REICHLING, 1999). Na vigência de danos à membrana celular – a qual é composta basicamente de fosfolipídios – a enzima fosfolipase A_2, presente em leucócitos e plaquetas, é ativada por citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a interleucina (IL)-1. Essa enzima provoca a degradação dos fosfolipídios, resultando na produção de ácido araquidônico (Figura 3). Esse, quando metabolizado, forma leucotrienos através da ação da enzima lipoxigenase, e PGs, prostaciclinas e tromboxanos, pela ação da enzima COX (VANEGAS & SCHAIBLE, 2001; HILÁRIO et al., 2006).

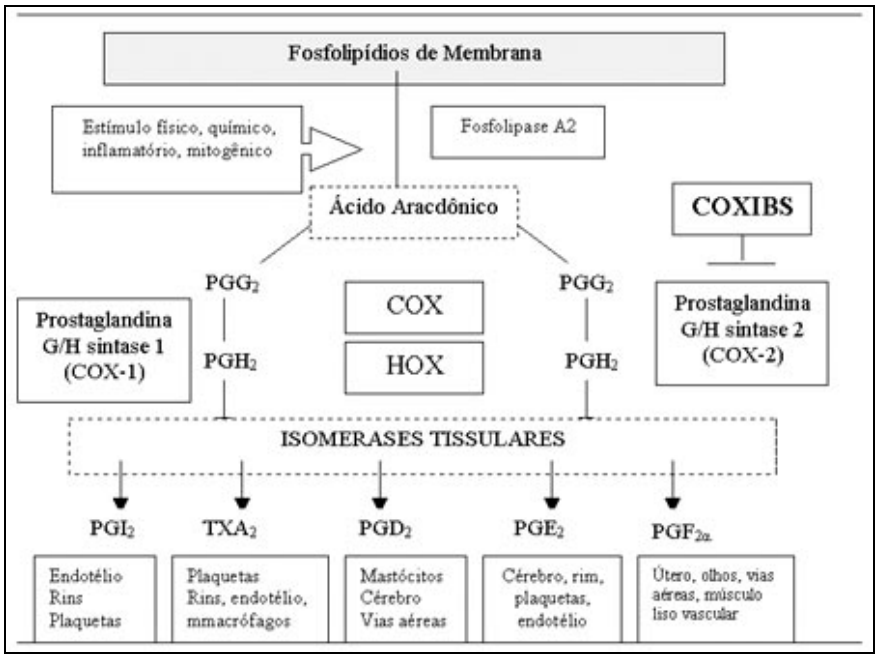

Figura 3 – Produção e ação das prostaglandinas. Após estímulo químico, físico ou humoral, fosfolipídios de membrana são mobilizados por ação da fosfolipase A_2, sendo convertidos em ácido araquidônico. As ciclooxigenases 1 e 2 convertem o ácido araquidônico em PGH_2 e PGG_2, as quais são transformadas nos prostanóides que agem fisiologicamente nos tecidos, ou no local da lesão produzindo a reação inflamatória. Adaptada de Fitzgerald e Patrono, 2001.

A COX converte, por oxigenação, o ácido araquidônico em dois componentes instáveis: prostaglandina G_2 e prostaglandina H_2, as quais são transformadas em prostaciclinas, tromboxano A_2 e prostaglandinas D_2, E_2 e $F_{2\alpha}$ por ação de isomerases (HILÁRIO et al., 2006). Nesse processo, a produção de prostanóides no local da lesão é um dos principais elementos da reação inflamatória (WOOLF, 2004).

Primeiramente descoberta, a COX-1 é uma enzima constitutivamente ativa, ou seja, ela origina o conjunto de PGs fisiológicas necessárias para a função celular

(MILLAN, 1999), tendo como principais efeitos a proteção da mucosa gástrica, a agregação plaquetária, a homeostase vascular e o balanço de sódio e água nos rins (GOZZANI, 2004; HILÁRIO et al., 2006). Assim, encontra-se presente em quase todos os tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino, rins (HILÁRIO et al., 2006)

Em 1991, contudo, o gene que codifica uma segunda isoforma da enzima foi identificado (XIE et al., 1991), sendo ela denominada de ciclooxigenase-2 (COX-2) (KULKARNI et al., 2000). A COX-2 converte o ácido araquidônico em prostaglandina H, a qual é transformada em prostanóides específicos, como a prostaglandina E_2 (PGE_2), por prostaglandinas sintases. Segundo Vane et al. (1998) as enzimas responsáveis por catalisar a síntese da COX-2, da fosfolipase-A_2 e da PGE_2 não estão constitutivamente presentes na maioria dos tecidos. A COX-2, por exemplo, seria induzida em resposta à presença de IL-1β e fator de necrose tumoral-α. Gozzani (2004), por outro lado, afirmou que a COX-2 possui ações fisiológicas nos ovários, útero, encéfalo, rins, cartilagens e ossos, o que é corroborado por Mitchell & Warner (1999).

Os produtos da COX, especialmente a PGE_2, modulam os sinais clássicos da inflamação, atuando sobre o surgimento da dor e do edema (MITCHELL & WARNER, 1999). Os prostanóides são os maiores mediadores da hiperalgesia que acompanha a inflamação, causando sensibilização dos receptores periféricos, reduzindo o limiar de ativação e aumentando sua responsividade a outros estímulos (KELLY et al., 2001; CONCEIÇÃO, 2004).

Adicionalmente, os produtos da COX atuam na ME facilitando a transmissão da resposta dolorosa (YAMAMOTO & NOZAKI-TAGUCHI, 1996). Tanto a COX-1 quanto a COX-2 estão presentes no cérebro e na ME, contudo parece haver regiões específicas onde cada isoforma é predominantemente expressa. (MITCHELL & WARNER, 1999). Enquanto a COX-2 aparece principalmente no córtex, hipotálamo e hipocampo (BREDER et al., 1995), a COX-1 é encontrada em quase todas as estruturas do SNC, sendo particularmente grande sua presença no telencéfalo (MITCHELL & WARNER, 1999). Entretanto, conforme demonstrado por Samad et al. (2001), algumas horas pós uma lesão periférica localizada, a COX-2 começa a ser expressa em neurônios de várias áreas do SNC. Essa expressão é iniciada não pelo influxo sensorial na ME, mas por um fator humoral circulante liberado pelas células inflamatórias, o qual induz a produção de COX-2. Como resultado da elevação nos níveis de PGE_2, ações pré e pós-sinápticas facilitam a transmissão ao longo da sinapse, aumentam a excitabilidade e

contribuem para o surgimento de uma fase tardia, prolongada e difusa da sensibilização central.

Posteriormente, um terceiro tipo de ciclooxigenase foi descrito, sendo denominado COX-3, o qual tem demonstrado ser sensível a fármacos analgésicos e antipiréticos (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

3.3 Inibidores da ciclooxigenase

Em 1893, quando o químico alemão Felix Hoffman motivou a Bayer® a produzir o ácido acetilsalicílico, patenteado como Aspirina®, não imaginava que os AINEs um dia seriam os fármacos mais amplamente prescritos e utilizados em todo o mundo (CARVALHO et al, 2004). Embora uma variedade de fármacos quimicamente distintos esteja incluída nesse grupo, os benefícios terapêuticos comuns a todos os AINEs incluem a inibição do edema e/ou da dor no sítio de inflamação. Em adição, alguns fármacos ainda exibem efeitos cardiovasculares, sobre a Doença de Alzheimer e o câncer (MITCHELL & WARNER, 1999).

Os efeitos colaterais dos AINEs, contudo, limitam seu uso em alguns pacientes. Dentre tais efeitos, o mais comum é a irritação e lesão da mucosa gastrointestinal, particularmente a mucosa gástrica. Cada membro da família dos AINEs apresenta algum nível individual de efeitos; todavia, o mecanismo de ação comum a todos os fármacos é o bloqueio da síntese de PGs através da inibição da COX, reduzindo, por conseguinte, a produção dos mediadores da resposta inflamatória aguda (MITCHELL & WARNER, 1999; WHITE, 2002).

Elucidando-se o mecanismo de ação dos AINEs veio à tona uma nova hipótese para explicar seus efeitos: enquanto a inibição da COX-2 é responsável pelos efeitos benéficos, a inibição da COX-1 desencadeia os efeitos colaterais (MITCHELL & WARNER, 1999). Com isso, teve início uma nova era de síntese de substâncias antiinflamatórias mais seletivas, direcionando as pesquisas para a elaboração de compostos que atuassem preferencialmente na inibição de isoenzimas específicas, com o objetivo de evitar a manifestação de efeitos colaterais (TASAKA, 1999). Todos os AINEs, contudo, apresentam algum efeito tanto sobre a isoenzima COX-1 quanto sobre COX-2 (GILRON et al., 2003).

3.3.1 Meloxicam

O meloxicam [4-hidroxi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxiamida 1,1-dióxido de sódio] é um analgésico e aintiinflamatório não-esteroidal pertencente à classe do ácido enólico, um dos derivados do oxicam (Figura 4). É um potente inibidor da COX, apresentando preferência pela isoenzima COX-2 (LEAL et al., 2008). Diferentemente de muitos outros AINEs, o meloxicam apresenta alta biodisponibilidade oral e uma longa meia-vida, o que o tornou um atraente analgésico para utilização na prática veterinária (TURNER et al., 2006).

Em ratos, o meloxicam é eliminado do sangue de maneira bifásica após administração intravenosa (IV) e uma diferença entre gêneros pode ser constatada durante a fase mais longa de eliminação, com as fêmeas mostrando uma eliminação mais demorada. Assim, a meia-vida do meloxicam após administração IV é de 13 horas nos machos e 37 horas nas fêmeas (BUSCH et al., 1998).

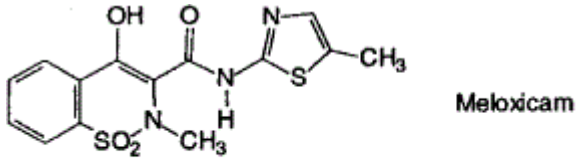

Figura 4 – Representação da fórmula química do meloxicam. Adaptada de Futaki et al., 1993.

Uma vez distribuído no sangue, mais de 90% do fármaco apresenta-se no plasma, sendo levado para diferentes órgãos. As maiores concentrações são encontradas no fígado, com níveis moderados nos rins, pele, pulmões e intestinos, e baixas concentrações na musculatura esquelética e SNC. A excreção renal constitui a principal rota de eliminação do meloxicam em ratos, correspondendo a aproximadamente 70% da dose administrada por via oral ou IV, sendo o restante eliminado pelas fezes. A eliminação completa do fármaco se dá em aproximadamente 96 horas nos machos, sendo mais tardia nas fêmeas (BUSCH et al., 1998). A duração da ação do meloxicam é, portanto, superior à do piroxicam, diclofenaco e indometacina (ENGELHARDT, 1996).

Segundo Engelhardt et al. (1995), diversos modelos animais de inflamação já foram empregados a fim de demonstrar os efeitos antiinflamatórios do meloxicam, dentre eles os modelos de edema de pata induzido por caolina ou carragenina, pleurisia

induzida por carragenina e artrite induzida por adjuvante. Em todos esses modelos o meloxicam foi capaz de suprimir a inflamação de forma prolongada após uma dose única

O mesmo autor, em 1996, afirmou que o meloxicam possui uma alta atividade intrínseca combinada com um baixo potencial ulcerogênico, isto é, um alto índice terapêutico, sendo esse superior ao de outros AINEs, incluindo piroxicam, diclofenaco e indometacina. Apesar destas características, seu emprego não está destituído de efeitos colaterais.

3.3.2 Efeitos antinociceptivos espinhais

É crescente o número de trabalhos mostrando evidências de que os AINEs apresentam, além da ação periférica reconhecida, um poderoso efeito nos estados de dor experimental que é independente de seus efeitos antiinflamatórios (VINEGAR et al., 1987). Adicionalmente à sua ação inibitória da síntese de PGs perifericamente, uma ação central dos AINEs tem sido sugerida por estudos experimentais nos quais esses fármacos demonstram uma maior potência pela via SA quando comparada à administração sistêmica (MALMBERG & YAKSH, 1992a; MALMBERG & YAKSH, 1992b). Ainda não está definido, contudo, se esse tipo de ação é exclusivamente espinhal ou se parte do efeito deve-se à absorção sistêmica do fármaco (YOON & YAKSH, 1999; CONCEIÇÃO, 2004).

Estudos têm demonstrado que ambas as formas da COX são constitutivamente expressas no cérebro e na ME de ratos (BREDER et al., 1995), sendo COX-2 a isoforma predominante no CDME, não somente na dor patológica inflamatória como na dor fisiológica normal (BURIAN & GEISSLINGER, 2005). Segundo Millan (1999), a administração periférica de capsaicina ou a exposição a estímulos inflamatórios é acompanhada por uma elevação dos níveis extracelulares de PG na ME e por uma maior expressão do gene da COX-2. Contudo, as relativas contribuições das fontes neuronais (fibras aferentes periféricas e neurônios intrínsecos) e não-neuronais nessa elevação dos níveis espinhais de PG ainda necessitam ser elucidados. Adicionalmente, Martin et al. (2007) relataram evidências experimentais de que a COX-2 constitutiva pode modular os processos centrais nociceptivos em humanos, independente da inflamação periférica.

Relatos de um significativo efeito antinociceptivo da administração dos AINEs pelas vias espinhais em diferentes espécies (MALMBERG & YAKSH, 1992a; WANG

et al., 1992) sugeriram que esses fármacos possam ser utilizados efetivamente, parcial ou completamente, em substituição aos opióides (WANG et al., 1995). A administração espinhal dos fármacos antiinflamatórios suprime o reflexo das fibras C, inibe a sensibilização neuronal no CDME e atenua a dor inflamatória de longa duração (BEICHE et al., 1996; BIANCHI & PANERAI, 1996; BUSTAMANTE et al., 1997; HERRERO et al., 1997; MALMBERG & YAKSH, 1992a; MCCORMACK, 1994; WILLINGALE et al., 1997).

Wang et al. (1995) demonstraram, por exemplo, que doses semelhantes de ibuprofeno foram capazes de produzir significativos efeitos analgésicos após administração epidural em coelhos, mas não após o uso intravenoso, sugerindo que o principal sítio de ação do ibuprofeno epidural seria a ME. Esse achado é consistente com o de Malmberg & Yaksh (1992b) de que os AINEs são "100-500 vezes mais ativos após administração espinhal, do que após a sistêmica". Yoon & Yaksh (1999), por sua vez, demonstraram que o ibuprofeno foi capaz de bloquear a elevação da liberação de PGs espinhais no teste da formalina em ratos, tanto após a administração espinhal quanto após a sistêmica.

Malmberg & Yaksh (1992a) constataram que a administração SA de AINEs produziu um significativo efeito analgésico, evidenciado por respostas comportamentais em animais nos quais foi empregado o teste da formalina. Esses experimentos mostraram uma significativa supressão dose-relacionada da resposta de segunda fase no teste (fase que se acredita ser indicativa de um estado hiperalgésico). Assim, esses estudos sugerem que a ação espinhal dos AINEs possa ser resultante de uma supressão da sensibilização espinhal.

Masue et al. (1999) demonstraram que a indometacina, o diclofenaco e o S-(+)-ibuprofeno foram capazes de suprimir a hiperalgesia térmica em ratos. Parris et al. (1996) constataram analgesia após a administração do cetorolaco de trometamina por via SA em ratos submetidos à constrição crônica do nervo ciático, um modelo de dor neuropática crônica. Wang et al. (1992), por sua vez, perceberam que a administração SA de ibuprofeno resultou em analgesia quando empregada em ratos submetidos ao teste de *tail-flick* (reflexo de retirada da cauda).

Em estudo de 1995, Wang et al. compararam a administração de doses semelhantes de S-(+)-ibuprofeno por via epidural e IV em coelhos e perceberam a ocorrência de antinocicepção sem bloqueio motor nos animais que receberam o fármaco epidural. Nenhum animal mostrou sinais de toxicidade sistêmica ou nervosa. Visto que

os animais que receberam o fármaco por via epidural apresentaram significativos efeitos analgésicos, o mesmo não ocorrendo naqueles submetidos à administração IV, os autores sugeriram que um sítio de ação espinhal – e não a absorção sistêmica – seja o responsável pela antinocicepção resultante do ibuprofeno epidural.

Estudos abordando a administração do meloxicam pelas vias espinhais são escassos. Pinardi et al. (2003) relataram efeitos antinociceptivos do meloxicam (bem como de outros AINEs) por via SA em camundongos submetidos a um teste algesiométrico para dor térmica e aguda não associada a inflamação. Segundo os autores, o efeito antinociceptivo do fármaco foi revertido pela administração sistêmica de atropina, sugerindo que vias facilitatórias colinérgicas muscarínicas possam representar um importante sistema de modulação da percepção dolorosa nesse modelo experimental.

Em trabalho de 2005, os mesmo autores demonstraram que a co-administração do meloxicam aumentou o efeito antinociceptivo da morfina quando utilizados por via SA, reduzindo o requerimento de opióide necessário para controle da dor visceral abdominal. Segundo os autores, essa possibilidade de combinação farmacológica pode ter relevância clínica em diversas situações, visto que os efeitos analgésicos da morfina sobre a dor visceral são limitados e geralmente requerem doses altas. Assim, a co-administração de inibidores da COX-2 pode ser útil no tratamento clínico de dores severas.

Takeda et al. (2005) estudaram o efeito da administração SA do meloxicam de forma contínua por vários dias sobre a dor neuropática, comparando-a à administração sistêmica em ratos. Os autores perceberam que o meloxicam SA preveniu o desenvolvimento de alodinia mecânica e hiperalgesia térmica, mas foi incapaz de alterar os limiares em modelos de dor neuropática já estabelecida. Assim, segundo os autores, a produção espinhal de PGs pela COX-2 parece ter um papel central no desenvolvimento dos estados de dor neuropática, mas não na sua manutenção. O meloxicam sistêmico, por outro lado, foi capaz de reverter parcialmente quadros de alodinia e hiperalgesia já instalados, indicando que a COX-2 periférica pode exercer um papel na manutenção da dor neuropática.

Recentemente, Kimura & Kontani (2009) demonstraram os efeitos do meloxicam sobre a alodinia associada à dor neuropática em camundongos com diabetes. Os autores observaram que a administração SA do meloxicam na dose de 30μg.animal^{-1}

exerceu um forte efeito antialodínico sobre a dor resultante da ligação do nervo ciático, sendo a avaliação realizada com o emprego dos filamentos de von Frey.

3.3 Modelo de dor inflamatória induzida pela carragenina

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas vermelhas da ordem Gigartinales (COSTA, 2004). Seu uso como agente indutor de edema plantar em ratos foi introduzido por Winter et al. em 1962. Posteriormente, Levy (1969) demonstrou que a carragenina também causa edema de pata em camundongos. Assim, a administração de carragenina intraplantar se tornou nos anos seguintes um modelo comumente empregado para avaliar a atividade antiinflamatória de vários agentes (DI ROSA & SORRENTINO, 1970).

Adicionalmente ao seu efeito exsudativo, a carragenina induz sensibilização dos nociceptores para estímulos mecânicos (KAYSER & GUILBAUD, 1987; VINEGAR et al., 1987; CAMPOS et al., 1999) e térmicos (ZHANG et al., 1997; SMITH et al.; 1998; OSBORNE & CODERRE, 1999), além de migração celular (ALMEIDA et al., 1980; HIGGS et al., 1980; VINEGAR et al., 1987; PINHEIRO & CALIXTO, 2002), entre outras manifestações da resposta inflamatória (COSTA, 2004).

De acordo com Posadas et al. (2004), a maioria dos estudos publicados abordando o potencial antiinflamatório de uma nova substância tem sido testada de acordo com os modelos propostos por Levy (1969) ou Sugishita et al. (1981). Dentre essas substâncias, uma variedade de AINEs tem sido estudada, muitos dos fármacos mostrando atividade antiinflamatória tanto no modelo experimental com camundongos quanto com ratos (CALHOUN et al., 1987).

Diversos são os estudos demonstrando o papel das ciclooxigenases e PGs na dor inflamatória induzida pela carragenina (DIRIG et al., 1998; FRANCISCHI et al.; 2002; NAKAYAMA et al., 2002; POSADAS et al., 2004; TORIYABE et al., 2004).

3.4 Neurotoxicidade das substâncias administradas pelas vias espinhais

De acordo com o *Interagency Committee on Neurotoxicology* (ICON), a neurotoxicidade compreende um amplo conceito que inclui efeitos adversos sobre a estrutura ou função do sistema nervoso central ou periférico, causado por agentes biológicos, químicos ou físicos. Ainda nesse contexto, os efeitos neurotóxicos podem

ser permanentes ou reversíveis e resultar em ações diretas ou indiretas sobre o sistema nervoso. Contudo, o sistema nervoso representa um desafio ao desenvolvimento de estratégias de avaliação de riscos relativos aos efeitos neurotóxicos, em vista da complexidade dos mecanismos envolvidos no seu desencadeamento (SLIKKER Jr & BOWYER, 2005).

Em uma abordagem clínica, o cerne da administração espinoaxial de fármacos compreende a redução da dose, maximização da eficácia e minimização dos efeitos colaterais quando seu sítio de ação é o SNC (CHOI et al., 2005). Contudo a aplicação direta de fármacos na ME pode potencialmente interromper vias específicas de dor e limitar os efeitos sistêmicos, mas também envolve o risco inerente de lesão do SNC. Por conseguinte, a neurotoxicidade das substâncias administradas pelas vias espinhais é uma questão de fundamental importância (HODGSON et al., 1999).

Com a introdução da cateterização espinhal, no final do século XIX, diversos fármacos foram injetados pela via espinoaxial, experimental ou clinicamente. Todavia, algumas dessas substâncias mostraram-se tóxicas ou potencialmente tóxicas (CHOI et al., 2005). Concomitantemente, os conservantes adicionados aos fármacos podem ser neurotóxicos quando injetados pela via espinhal (MALINOVSKY et al., 1993).

Após a exposição a um fármaco administrado pela via espinhal, a toxicidade sobre a ME ou nervos espinhais pode se manifestar como desarranjos histológicos, fisiológicos ou comportamentais/clínicos. A neurohistopatologia geralmente inclui lesões neurais, gliose, danos à bainha de mielina e alterações inflamatórias, podendo ocorrer também envolvimento das camadas celulares da membrana aracnóide. Fisiologicamente ocorrem alterações no fluxo sanguíneo da ME, lesão da barreira hematoencefálica e mudanças eletrofisiológicas dos impulsos de condução. Os sinais comportamentais e clínicos de neurotoxicidade, por fim, incluem dor, deficiências sensoriais e motoras, bem como disfunções intestinais ou urinárias. Com base nisso, de modo ideal, um conjunto de testes histológicos, fisiológicos e comportamentais deveria ser realizado em diversas espécies animais antes que qualquer fármaco tivesse seu uso espinhal difundido clinicamente (HODGSON et al., 1999).

Sinais neurológicos ou alterações histológicas medulares graves já foram observados após o emprego espinhal de diversas classes farmacológicas, como anestésicos locais (READY et al., 1985; KIRIHARA et al., 2003; YAMASHITA et al., 2003; MUGURUMA et al., 2006; VASCONCELOS FILHO et al., 2008), benzodiazepínicos (SVENSSON et al., 1995;), quimioterápicos (SIEGAL, et al., 2006)

e anestésicos dissociativos (VRANKEN et al., 2006) em diferentes espécies. No que se refere ao uso de AINEs pelas vias espinhais, diferentes trabalhos têm sido realizados, com resultados variáveis (AMIOT et al., 1986; KORMAZ et al., 2004; GUEVARA-LÓPEZ et al., 2006; CANDUZ et al., 2007).

Os estudos empregando o meloxicam pelas vias espinhais (PINARDI et al., 2003; PINARDI et al., 2005; TAKEDA et al., 2005; KIMURA & KONTANI, 2009), contudo, permanecem escassos. Apesar de em nenhum ter sido constatada a ocorrência de sinais clínicos de lesões neurológicas, trabalhos que avaliem possíveis lesões histopatológicas de neurotoxicidade não parecem existir na literatura até o momento, sendo um dos objetivos do presente estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, machos adultos, com peso corporal de 300-450g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas e do Instituto de Tecnologia do Paraná. Durante o período prévio ao estudo, que correspondeu a um mínimo de 14 dias, os animais foram alojados em caixas plásticas retangulares (40 x 30 x 15cm) contendo cinco animais cada, sob temperatura controlada (21-24^{o}C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Ração comercial e água foram fornecidas *ad libitum*. Uma vez por semana as caixas foram higienizadas, e diariamente as condições clínicas de todos os animais foram avaliadas, a fim de que quaisquer alterações de saúde pudessem ser detectadas e adequadamente tratadas. A pesquisa foi desenvolvida na UEA e no Laboratório de Patologia Experimental do HCPA, bem como no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com orientações para cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizado e os estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes dos tratamentos com fármacos, tendo sido o tamanho amostral calculado por análise estatística. O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso de Animais do HCPA e aprovado, estando registrado sob o número 100147 (Anexo 1).

4.2 Grupos Experimentais

Foram utilizados 27 animais, distribuídos aleatoriamente em três grupos de nove animais cada, assim denominados:

- Grupo I (GI): animais submetidos à administração de 5µL de solução salina pela via subaracnóidea;
- Grupo II (GII): animais submetidos à administração de 30µg de meloxicam diluídos em solução salina até um volume final de 5µL pela via subaracnóidea;
- Grupo III (GIII): animais submetidos apenas à colocação da cânula no espaço subaracnóideo.

Ao contrário dos demais, os animais pertencentes ao GIII, dessa forma, não receberam qualquer fármaco pela via SA, sendo utilizados como controle das lesões clínicas e histopatológicas causadas somente pela colocação e manutenção da cânula.

4.3 Fármacos

O meloxicam sódico foi adquirido comercialmente da Galena Química e Farmacêutica Ltda. (SP, Brasil), sendo preparada uma suspensão de 3mg do fármaco em 0,5mL de solução salina estéril[1], de onde foram obtidos 5µL (30µg) para administração SA. A carragenina-lambda, por sua vez, foi adquirida junto à Sigma-Aldrich Co. (MO, USA), sendo diluídos 25mg do agente em 1mL de solução salina estéril, utilizando-se 0,1mL (250µg) da solução para aplicação nos animais. O preparo dos fármacos foi realizado no dia do ensaio.

4.4 Implantação da cânula subaracnóidea

A implantação da cânula no espaço subaracnóide foi realizada de acordo com uma modificação da técnica descrita por Yaksh & Rudy (1976). Os animais foram previamente pesados e anestesiados com cloridrato de cetamina[2] ($100mg.kg^{-1}$) e cloridrato de xilazina[3] ($10mg.kg^{-1}$), ambos pela via intraperitoneal (IP). A seguir, ceftriaxona dissódica[4] ($100mg.kg^{-1}$, IP) foi administrada, realizando-se, cerca de 15 minutos depois, tricotomia da região atlantooccipital. Os animais foram acomodados em uma mesa cirúrgica para roedores, em decúbito ventral, com os membros anteriores e posteriores fixados em abdução e com a região da cabeça levemente elevada em relação ao resto do corpo. Durante a localização do espaço atlantooccipital e colocação da cânula, o pescoço foi mantido flexionado em um ângulo de aproximadamente 45°, de modo a permitir uma maior abertura do espaço intervertebral. Ao longo do procedimento, oxigênio a 100% ($500\text{-}600mL.min^{-1}$) foi fornecido a todos os animais com o auxílio de uma máscara confeccionada a partir do corte de uma seringa de 10mL.

---

[1] Cloreto de sódio a 0,9%, Indústria Farmacêutica Basa Ltda, Caxias do Sul – RS, Brasil
[2] Cetamin 10%, Syntec do Brasil, Cotia – SP, Brasil
[3] Anasedan 2%, Ceva Vetbrands, Paulínia – SP, Brasil
[4] Ceftriaxona dissódica, Novafarma Indústria Farmacêutica, Anápolis – GO, Brasil

Após anti-sepsia da pele da região atlantooccipital, uma incisão vertical com aproximadamente 2cm de comprimento foi realizada na linha média da região, iniciando no ponto entre as orelhas e se estendendo caudalmente, empregando-se para isso uma lâmina de bisturi n°20. O tecido subcutâneo e os músculos *biventer cervicis* e *rectus capitis dorsalis maior* foram afastados por dissecação romba utilizando um par de agulhas 18-Gauge cuja ponta foi previamente curvada. Com o afastamento da musculatura, a dura-máter e a cisterna magna foram visualizadas como um triângulo invertido, claro e cintilante, através do qual a medula oblonga, a artéria *dorsalis spinalis* e o espaço contendo líquido cefalorraquidiano ficaram visíveis. A localização de tais estruturas foi realizada por observação direta ou com o auxílio de microscópio cirúrgico, quando necessário. Assim, após a exposição da membrana atlantooccipital, uma agulha 18-Gauge foi empregada para puncionar sua região central, até que ocorresse saída de líquido cefalorraquidiano. Uma cânula de polietileno PE-10[5] (0,28mm de diâmetro interno e 0,64mm de diâmetro externo) foi, então, inserida através do orifício e avançada 8,5cm caudalmente no interior do espaço subaracnóide, até alcançar a região do alargamento lombar. A mensuração, o corte e a marcação das cânulas com tinta esmalte foram realizados no período prévio ao experimento, sendo esse material individualmente embalado e esterilizado com óxido de etileno.

A porção cranial da cânula foi inserida através de uma agulha 18-Gauge, permitindo sua acomodação no tecido subcutâneo, de modo a emergir da pele próximo ao topo da cabeça. Os músculos e a pele foram suturados com fio mononylon 4-0 e sutura contínua simples, e a extremidade externa do cateter foi ocluída com a inserção de um pequeno fragmento de agulha dental (30G x 21mm). Por fim, a porção externa da cânula foi fixada à pele com sutura, empregando-se para isso fio mononylon 4-0 e pontos isolados simples. A Figura 5 ilustra o procedimento de implantação da cânula SA.

[5] #BB31695-PE/1, Scientific Commodities, Lake Havasu City - AZ, USA

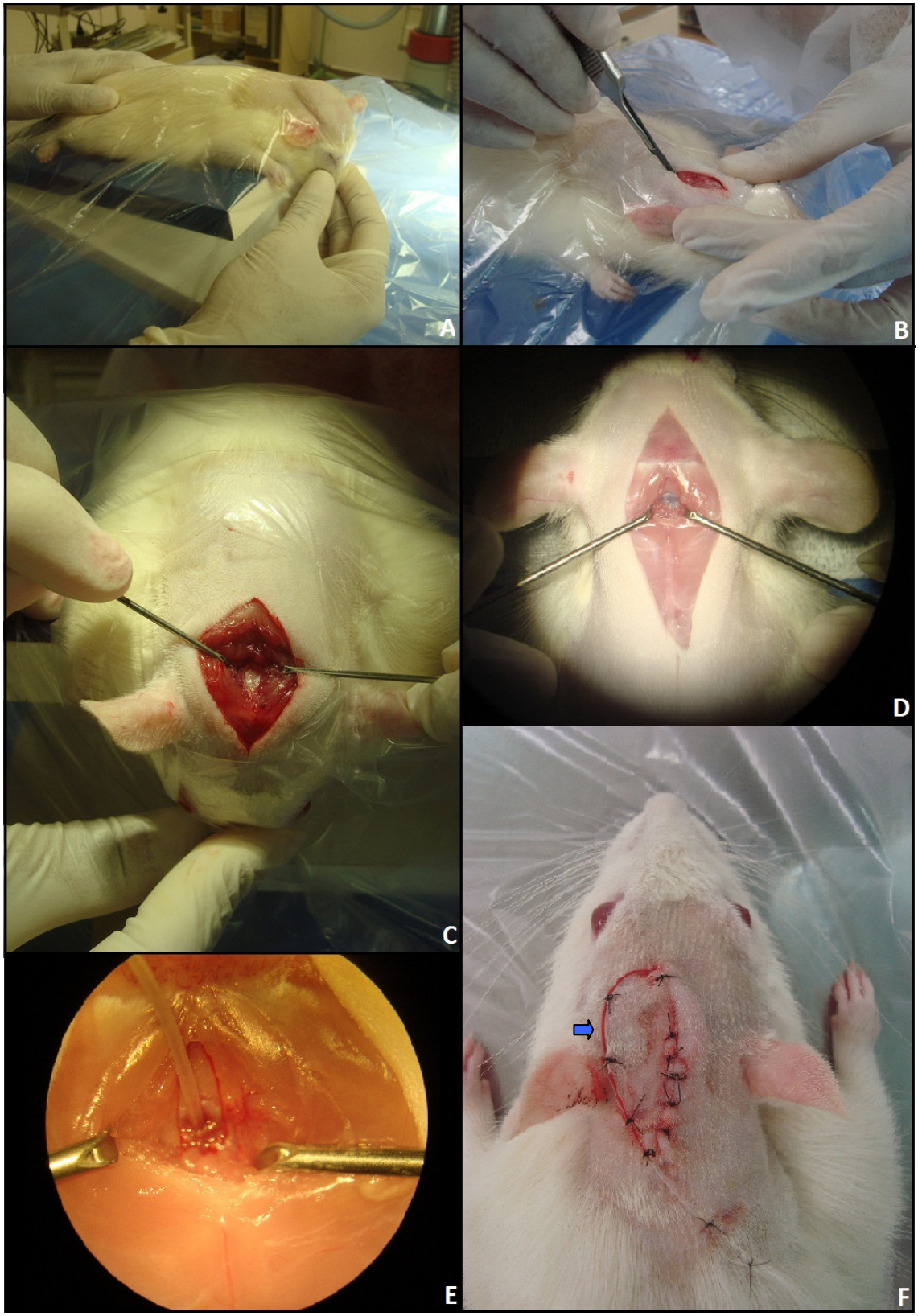

Figura 5 – Procedimentos de implantação da cânula SA. **A.** Acomodação do animal em mesa cirúrgica para roedores, em decúbito esternal, com o pescoço flexionado. **B.** Realização de incisão vertical se iniciando entre as orelhas e se estendendo cerca de 2cm causalmente. **C.** Dissecação e afastamento da musculatura com par de agulhas 18-Gauge. **D.** Visualização da região cisternal ao miscroscópio cirúrgico. **E.** Inserção da cânula SA através da membrana atlantooccipital. **F.** Aspecto final após sutura dos tecidos e fixação da cânula. Observar a presença de sangue no interior da cânula (seta).

4.5 Procedimentos pós-operatórios

Finalizado o procedimento, os animais foram alojados em caixas plásticas e mantidos em incubadora com aquecimento e fornecimento de oxigênio até a completa recuperação anestésica.

Durante o período que se seguiu à implantação da cânula, os animais foram mantidos em caixas plásticas individuais, com alimentação e água ofertados *ad libitum*, sob as mesmas condições ambientais do período prévio. No dia seguinte à colocação da cânula, os animais foram avaliados, de modo que déficits neurológicos pudessem ser constatados. Aqueles que apresentaram alterações neurológicas foram excluídos do estudo.

4.6 Teste da hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina

Um dia após a colocação da cânula, os animais dos grupos GI e GIII foram submetidos ao teste de avaliação da hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina. Para isso, foi empregado um analgesímetro digital[6] e a técnica previamente descrita por Vivancos et al. (2004), na qual um transdutor de pressão equipado com uma ponteira de polipropileno de 7mm^2 foi aplicado perpendicularmente à superfície plantar direita dos animais, com uma pressão linearmente crescente. O equipamento registrou a força exercida, expressa em gramas (g), com precisão de 0,1g. A estimulação do membro foi repetida até que o animal apresentasse três mensurações semelhantes (a diferença entre o valor mais alto e o mais baixo fosse inferior a 10g). Assim, o comportamento nociceptivo foi quantificado através da média de três valores expressos em gramas, que representa o limiar de retirada da pata ao estímulo mecânico, em cada momento de avaliação.

Foram considerados como resposta positiva a retirada do membro do contato com a ponteira ou o comportamento de sacudir e/ou lamber o membro no momento ou imediatamente após a estimulação (*flinch*). A ambulação foi considerada uma resposta ambígua, logo, quando ocorreu no momento da aplicação do teste, este foi repetido.

Aproximadamente trinta minutos antes do início das avaliações, os ratos foram transferidos para o local de realização dos testes, constituído por caixas acrílicas com assoalho de tela aramada não-maleável, em uma sala silenciosa, permitindo sua

[6] Insight Ltda Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto – SP, Brasil

aclimatização, constatada pelo cessar do comportamento de limpeza e exploração do local. Ao longo desse período, foram realizadas aproximadamente cinco estimulações dos membros dos animais, de modo a permitir sua familiarização com o estímulo aplicado. Logo a seguir, foram estabelecidos os valores basais de cada animal.

Uma vez registrados os valores basais, os animais foram contidos manualmente, procedendo-se a retirada do fragmento metálico oclusivo do cateter. A seguir, meloxicam ou solução salina foi administrada com o auxílio de uma microseringa Hamilton de 10μL[7] durante um período de 30 segundos. Realizado tal procedimento, 10μL de solução salina estéril foram injetados para lavagem do cateter.

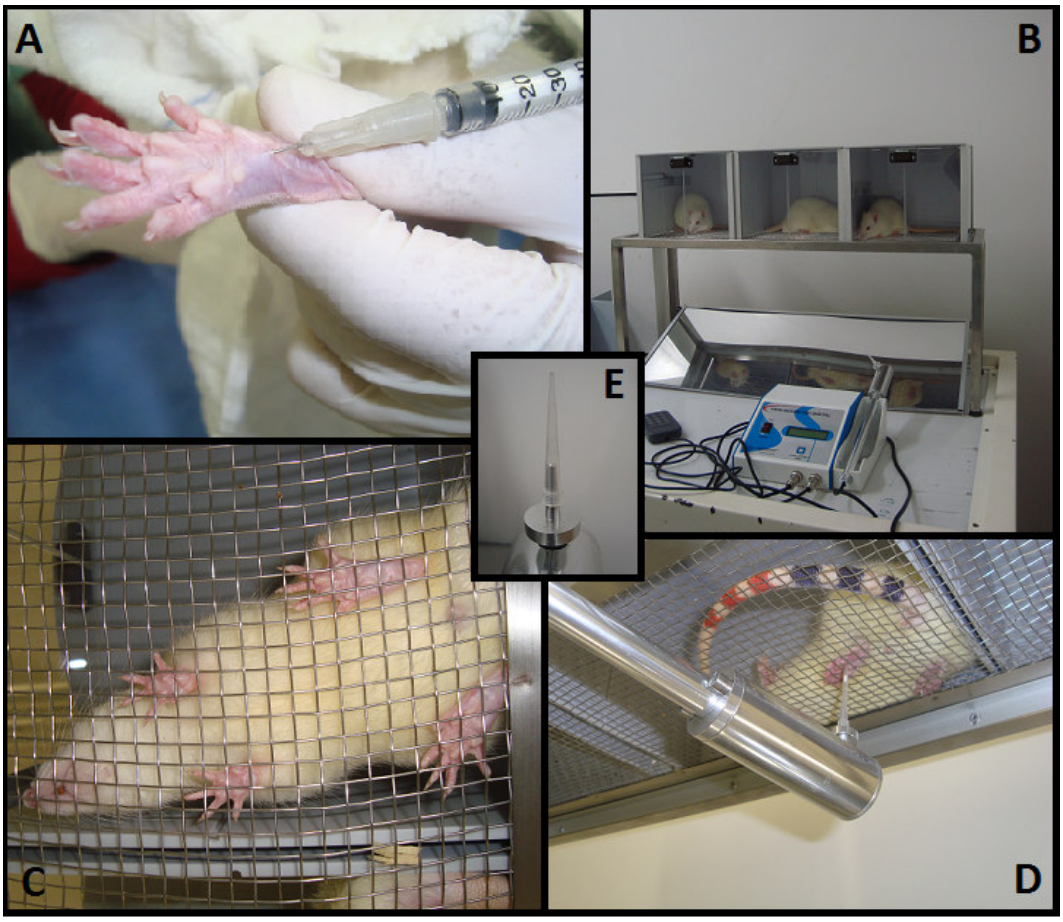

Figura 6 – Procedimentos de avaliação da hipernocicepção mecânica. **A.** Injeção de carragenina na região intraplantar do membro direito. **B.** Acomodação dos animais em caixas acrílicas com fundo de tela aramada. **C.** Visão ventral dos animais acomodados para a realização dos testes. **D.** Aplicação de força mecânica sobre a região intraplantar até a obtenção de resposta aversiva. **E.** Detalhe da ponteira de polipropileno de 7mm^2 acoplada ao transdutor de pressão utilizado para estimulação mecânica.

[7] 701N, Hamilton Company, Reno – NV, USA

Imediatamente após a administração das substâncias no espaço subaracnóideo, carragenina-lambda (0,1mL de carragenina 2,5%) foi injetada na região intraplantar do membro direito, seguindo a técnica descrita por Francischi et al. (2002).

O momento da injeção da carragenina foi registrado como tempo 0 (T_0), e as avaliações posteriores foram realizadas a cada 30 minutos durante as quatro horas posteriores à administração do fármaco, para se obter um perfil temporal de ação da mesma. Todas as avaliações foram realizadas por um componente que desconhecia o tratamento ao qual cada animal fora submetido.

Uma vez que os animais foram testados nos períodos anteriores e posteriores à administração dos fármacos, os resultados foram registrados como o Δ do limiar de retirada (g), calculado subtraindo-se o valor das mensurações após os tratamentos, do valor basal, e esses valores foram confrontados.

A Figura 6 ilustra a técnica de avaliação da antinocicepção mecânica utilizada no experimento.

4.7 Eutanásia e coleta de material

Transcorridos um, sete e 14 dias do procedimento de implantação da cânula, três animais de cada grupo foram anestesiados com 200mg.kg^{-1} de tiopental sódico[8] IP. Constatada a obtenção de anestesia profunda, iniciou-se o procedimento de eutanásia e fixação da medula pelo método de perfusão transcardíaca (MILLER, 1998; KASUKURTHI et al., 2009). Para isso, os animais foram acomodados em decúbito dorsal, com os membros mantidos em abdução. A seguir, foi realizada uma ampla abertura da cavidade abdominal para exposição do diafragma. Após a secção do mesmo, junto à sua origem esternocostal, a cavidade torácica foi aberta lateralmente, através da secção das costelas, para exposição do coração. Realizou-se, assim, a punção do ventrículo esquerdo, utilizando-se para isso a porção flexível de um cateter percutâneo 14-Gauge, cortado em bisel de forma a reduzir seu comprimento para aproximadamente 1,5cm. Através desse orifício, solução salina estéril foi perfundida, seguindo a proporção de 1mL de solução para cada 1g de peso corporal do animal, para remoção do sangue do interior dos vasos. Tão logo iniciada a administração da solução salina, procedeu-se a localização e a punção da veia cava caudal, constituindo o orifício de

[8] Thiopentax 1g, Cristália Produtos Químicos Framacêuticos Ltda, Itapira – SP, Brasil

saída dos líquidos infundidos. Finalizada a exsanguinação completa dos tecidos, um volume semelhante de formalina 10% tamponada foi infundido através da mesma via. A infusão dos fluidos foi realizada por gravidade, utilizando-se uma altura não superior a 60cm do corpo do animal. A coluna vertebral foi, então, dissecada e removida integralmente, desde o espaço atlantooccipital até o início da cauda. Os procedimentos de eutanásia e coleta de material encontram-se ilustrados na Figura 7.

Uma vez dissecadas, as colunas vertebrais foram mantidas em formalina neutra tamponada a 10% por 14-21 dias, sendo, a seguir, descalcificadas em ácido nítrico a 5% por 48 horas para processamento do material.

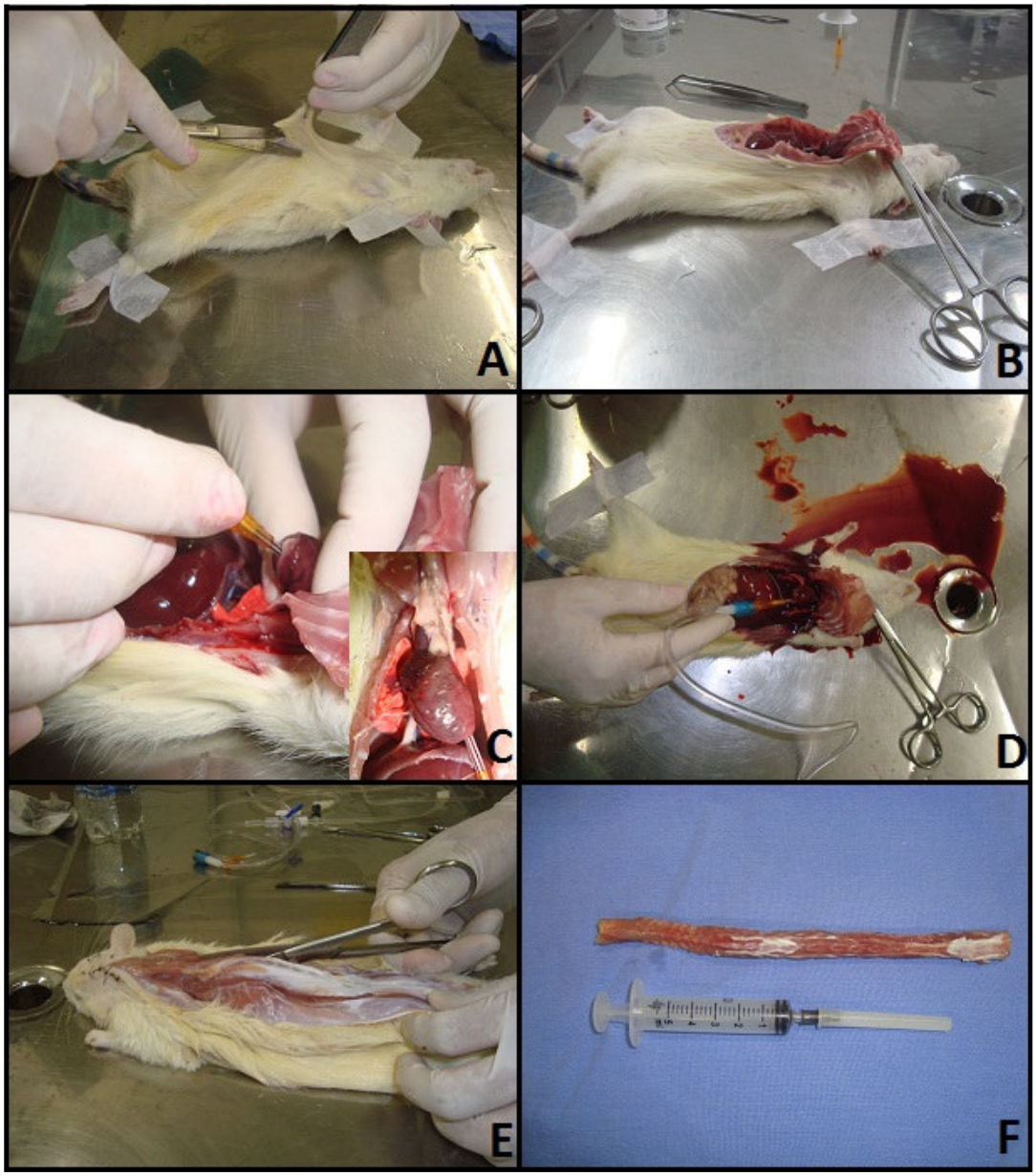

Figura 7 – Procedimentos de eutanásia e coleta de material. **A.** Após anestesia e acomodação do animal em decúbito dorsal, realização de ampla abertura da cavidade abdominal, expondo o diafragma. **B.** Secção das costelas, permitindo a abertura da cavidade

torácica e acesso ao coração. **C.** Punção do ventrículo esquerdo com cateter percutâneo 14-Gauge cortado em bisel. **D.** Infusão de fluidos através do dispositivo intracardíaco, com saída dos líquidos pelo orifício na veia cava caudal. **E.** Dissecação integral da coluna vertebral desde a região atlantooccipital até a o início da cauda. **F.** Aspecto final da coluna vertebral após sua remoção.

4.8 Avaliação da neutoxicidade

4.8.1 Avaliação da função clínica neurológica

No período posterior à colocação da cânula, os animais de todos os grupos foram pesados e observados diariamente por um membro do projeto, monitorando-se quaisquer alterações fisiológicas e/ou comportamentais. Esse observador desconhecia o tratamento ao qual cada animal fora submetido, e realizou avaliações diárias da função neurológica dos animais, tendo sido previamente treinado para reconhecer o comportamento normal da espécie. O exame de avaliação neurológica individual foi realizado empregando-se uma modificação do método proposto por Ready et al. (1985), e abrangeu três funções neurológicas: habilidade de andar, flexão do membro pélvico e sensação cutânea, sendo esses pontuados conforme o seguinte critério: 0 - normal; 1 - diminuído e 2 – ausente (Apêndice A). A habilidade de andar foi avaliada por meio da colocação do animal sobre superfície plana e observação da sua deambulação, enquanto que a flexão do membro pélvico caracteriza uma reação normal do animal logo que é levantado de uma superfície. A sensação cutânea, por fim, foi avaliada por meio da pesquisa de resposta aversiva ao pinçamento da pele da região lombossacra, utilizando-se para isso uma pinça longa, tipo hemostática. A verificação da quantidade de lesões clínicas proporcionada pelos tratamentos foi determinada pela soma dos pontos dos três exames, tendo sido estabelecido um escore máximo de 3, a partir do qual foi determinada a opção pela eutanásia do animal, a fim de evitar sofrimentos desnecessários.

4.8.2 Avaliação da variação do peso corporal

Para avaliação da variação no peso corporal, os animais foram pesados imediatamente antes do procedimento de colocação da cânula SA, correspondendo ao

dia 0 (basal), e diariamente no período que se seguiu até a eutanásia, empregando-se para isso uma balança eletrônica de precisão[9].

4.8.3 Avaliação histopatológica da medula espinhal

Empregando-se os corpos vertebrais como referência espacial, as colunas vertebrais dissecadas foram divididas em três segmentos: cervical, torácico e lombrossacro, sendo, a seguir, realizada a abertura das porções ósseas e a remoção das medulas espinhais. Em cada segmento foram realizados cortes macroscópicos de aproximadamente 5mm de espessura. O material foi emblocado em parafina seguindo a técnica de rotina e, para avaliação, foram realizados cortes microscópicos de 4µm de espessura, os quais foram processados para exame histológico, corados por hematoxilina-eosina e Luxol *fast blue*.

O exame histopatológico envolveu a observação de diferentes alterações teciduais, como: hipertrofia dural, adesão das meninges aos tecidos adjacentes, inflamação meningeal, degeneração da substância branca, doença degenerativa da substância cinzenta, e danos à bainha de mielina. Como resultado, as lesões observadas em cada segmento da ME foram classificadas em ausentes (0), leves (1), moderadas (2) ou severas (3), e a soma das alterações oriundas de todos os segmentos deu origem a um escore de lesão medular total (LMT) para cada animal. Todas as avaliações microscópicas foram realizadas por um examinador que desconhecia o tratamento ao qual cada animal fora submetido.

4.9 Análise Estatística

Após tabulação dos dados, realizou-se a análise estatística (SAS versão 8.0 para Windows). Para responder o objetivo do estudo foram descritos os valores do Δ do limiar de retirada segundo os diferentes grupos a cada 30 minutos com uso de medidas resumo (média e desvio padrão). Os valores foram comparados com uso de análise de variâncias com medidas repetidas e dois fatores, sendo o grupo (GI ou GII) o fator fixo e o momento (tempo a cada 30 minutos) o fator de repetição. Para a análise foi suposta matriz de correlações não estruturadas entre os momentos de avaliação. Para avaliação

[9] AS5500C, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda, Sta Rita do Sapucaí – MG, Brasil

do peso ao longo dos dias foi aplicada a mesma análise, porém com três grupos e suposta matriz de correlações entre os momentos componente simétrica. Foram aplicadas comparações múltiplas de Tukey entre os grupos ou momentos dois a dois quando a análise de variância (ANOVA) apresentou significância estatística, a fim de verificar onde ocorreram as diferenças.

Para comparar os escores de severidade em cada segmento, o LMT e o número de locais com lesões mínimas, moderadas e severas entre os grupos e os dias de eutanásia foram descritos os resultados com uso de frequências absolutas e relativas, realizando-se testes Kruskal-Wallis para comparar os grupos. Para verificar a existência de associação entre a presença de lesões em cada local e o grupo experimental foram realizados testes exatos de Fisher. Por fim, para comparação do grau de severidade da lesão entre os segmentos avaliados foi realizado teste de Friedman.

Um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi utilizado em todos os testes do estudo.

5 RESULTADOS

5.1 Modelo Animal

A utilização de ratos da linhagem Wistar, selecionados para a realização deste trabalho, mostrou-se adequada para a reprodução do modelo de dor aguda inflamatória, permitindo a adequada avaliação das diferentes variáveis antinociceptivas e neurológicas, além de serem animais de fácil manipulação e baixo custo de manutenção.

5.2 Procedimento Anestésico

O protocolo anestésico empregado no procedimento de implantação da cânula SA mostrou adequada analgesia, hipnose e relaxamento muscular, permitindo a abordagem e manipulação dos tecidos sem que os animais demonstrassem desconforto.

A recuperação anestésica, apesar de relativamente longa, foi satisfatória, visto que todos os animais encontravam-se alertas e plenamente recuperados no dia seguinte à implantação da cânula SA.

Do total anestesiado para implantação da cânula, três animais morreram em decorrência da anestesia e um sofreu parada cardiorrespiratória. Esse animal apresentou total recuperação após a realização das manobras de ressuscitação cardiopulmonar, contudo foi excluído do estudo.

5.3 Implantação da Cânula Subaracnóidea

A técnica de implantação da cânula SA mostrou-se relativamente fácil e de rápida realização. As intercorrências mais comuns durante o procedimento foram: dificuldade de introdução da cânula no orifício da dura-máter; hemorragia leve da musculatura e/ou tecido subcutâneo; dificuldade na inserção da cânula ao longo do espaço SA; e presença de sangue no LCR.

Para que se alcançasse o número de 27 animais necessários ao estudo, contudo, um total de 53 ratos foi submetido à implantação da cânula, demonstrando uma taxa de sucesso de 50,94%. Do total de animais do estudo: cinco (9,43%) apresentaram como causa da exclusão a presença de hemorragia subaracnóidea grave no momento da implantação, sendo imediatamente eutanasiados, enquanto que 21 animais (39,62%)

mostraram déficits neurológicos no dia seguinte à inserção da cânula (Figura 8). A Figura 9 demonstra a distribuição dos animais de acordo com a causa de exclusão do estudo.

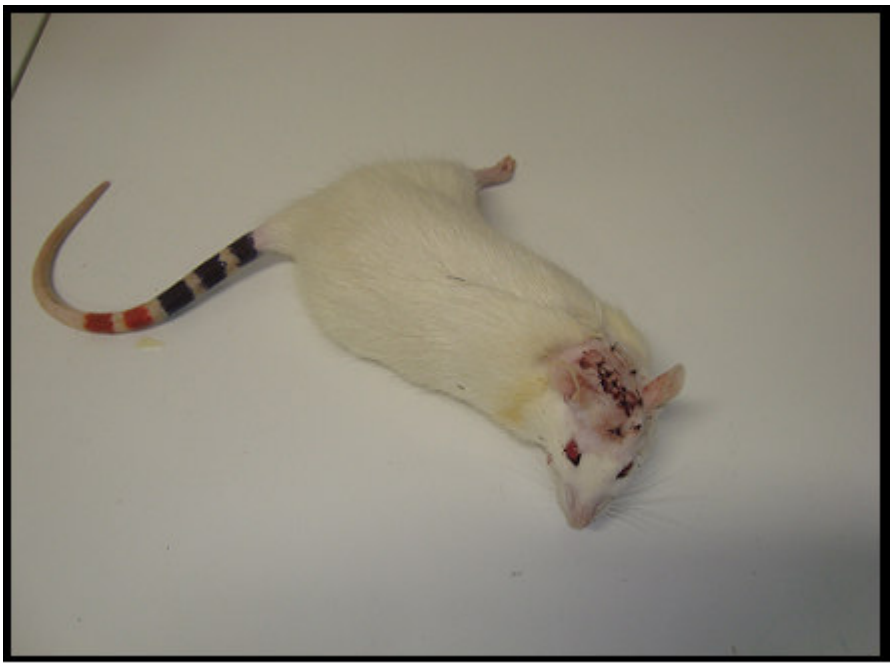

Figura 8 – Presença de alteração neurológica em rato submetido à implantação da cânula subaracnóidea. Animal apresentando incapacidade de manter-se em estação, paralisia flácida dos membros pélvicos e tendência a andar em círculos.

A cânula SA apresentou-se funcional em todos os 18 ratos dos grupos GI e GII no dia seguinte à sua implantação, permitindo a adequada administração dos fármacos. Contudo, em oito animais a extremidade externa na cânula desprendeu-se do tecido cutâneo durante o período de avaliação, sendo necessária a recolocação dos pontos de sutura, enquanto que dois animais removeram a cânula em sua totalidade um dia antes do fim das avaliações. Estes animais, ambos pertencentes ao GIII, foram mantidos no estudo e observados quanto à presença de alterações clínicas e neurológicas, as quais não foram constatadas.

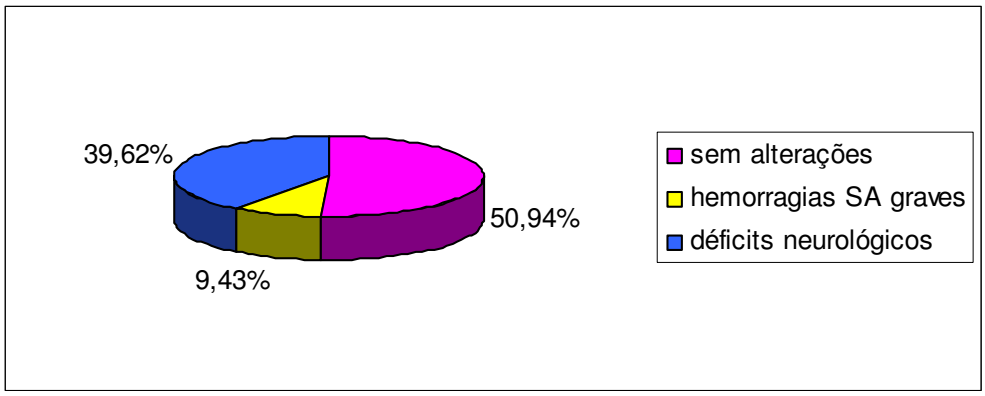

Figura 9 – Distribuição dos animais experimentais submetidos à implantação de cânula subaracnóidea, de acordo com a presença e etiologia de alterações que implicassem na exclusão do estudo.

5.4 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

5.4.1 Efeitos do meloxicam SA sobre a hipernocicepção inflamatória induzida pela carragenina

A fim de verificar a capacidade do meloxicam em interferir na hipernocicepção mecânica de origem inflamatória, ratos submetidos à administração intraplantar de carragenina foram avaliados no teste de pressão crescente com um analgesímetro digital. Os valores do Δ do limiar de retirada e seus desvios padrões correspondentes em cada um dos momentos de avaliação encontram-se demonstrados na Figura 10.

A administração SA do meloxicam na dose de 30µg.animal^{-1} não foi capaz de alterar a resposta hipernociceptiva nos animais experimentais, não sendo observadas diferenças estatísticas entre a administração do fármaco e da solução salina.

Os valores médios do Δ do limiar de retirada foram menores no grupo tratado com meloxicam ao longo de todos os momentos de avaliação entre 45 e 165 minutos, apesar de não ter sido demonstrada significância estatística ($p = 0,835$) para essa diferença. No Apêndice B são apresentados os valores do Δ do limiar de retirada em cada um dos animais dos diferentes grupos experimentais.

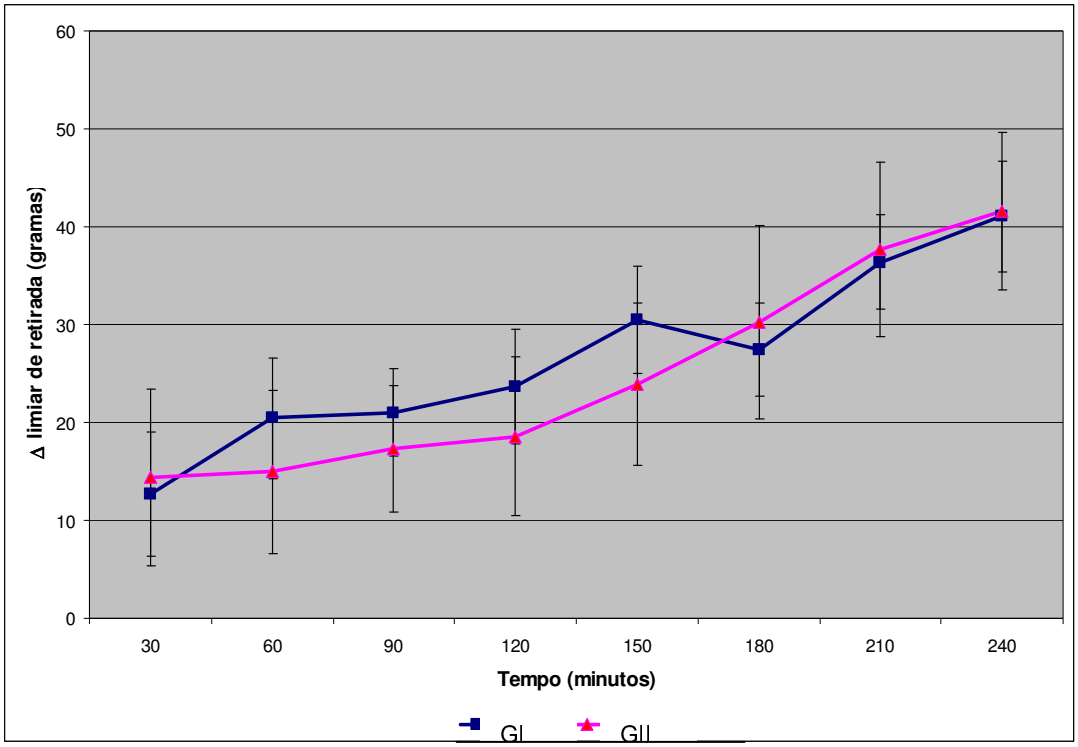

Figura 10 – Valores médios do Δ do limiar de retirada ± desvio padrão (g) nos diferentes momentos de avaliação da hipernocicepção mecânica em ratos submetidos à administração SA de solução salina (GI) ou meloxicam (GII).

Diferenças médias no Δ do limiar de retirada ocorreram entre os momentos de avaliação dentro de cada grupo ($p < 0,001$). Um aumento médio do Δ do limiar de retirada ocorreu com o passar do tempo, sendo os seus valores estatisticamente maiores nas avaliações com 210 e 240 minutos em relação às demais ($p < 0,05$). Diferenças entre outros momentos de avaliação puderam ser constatadas, sempre havendo aumento médio do Δ do limiar de retirada com o transcorrer do experimento (Tabela 1).

Tabela 1 – Diferença média, erro padrão e valor de p do Δ do limiar de retirada (g) nos ratos dos grupos GI e GII, no diferentes momentos de avaliação da hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina.

Avaliações	Diferença média estimada	Erro padrão	p
30-60 min	-4,13	3,38	0,914
30-90 min	-5,60	3,82	0,813
30-120 min	-7,59	2,96	0,234
30-150 min	-13,64	4,03	0,055
30-180 min	-15,30	4,24	**0,036**
30-210 min	-23,50	3,68	**< 0,001**
30-240 min	-27,76	2,53	**< 0,001**
60-90 min	-1,47	2,42	0,998

60-120 min	-3,46	2,58	0,872
60-150 min	-9,51	3,13	0,104
60-180 min	-11,16	3,67	0,104
60-210 min	-19,37	2,71	**< 0,001**
60-240 min	-23,63	2,88	**< 0,001**
90-120 min	-1,99	2,84	0,996
90-150 min	-8,04	2,67	0,111
90-180 min	-9,70	3,35	0,136
90-210 min	-17,90	2,71	**< 0,001**
90-240 min	-22,16	2,99	**< 0,001**
120-150 min	-6,06	2,41	0,254
120-180 min	-7,71	3,81	0,497
120-210 min	-15,92	2,22	**< 0,001**
120-240min	-20,18	2,80	**< 0,001**
150-180 min	-1,65	3,37	1,000
150-210 min	-9,86	2,60	**0,025**
150-240 min	-14,12	3,02	**0,004**
180-210 min	-8,21	2,36	**0,046**
180-240 min	-12,47	3,03	**0,013**
210-240 min	-4,26	2,48	0,677

Durante a avaliação da antinocicepção, dois ratos, ambos pertencentes ao GI, apresentaram respostas clinicamente diferenciadas após a indução da hiperalgesia. Esses animais mostraram a presença de secreção ocular, significativo abatimento, com vocalizações em repouso e reluta em apoiar o membro submetido à aplicação de carragenina, sugerindo a presença de dor intensa. Como resultado, a avaliação antinociceptiva desses ratos apresentou um grau de dificuldade elevado em relação ao demais, visto que os animais não permitiam que força fosse exercida contra a superfície plantar durante a aferição. Nesses casos, os animais erguiam o membro afetado, acompanhando o movimento da ponteira, não exercendo resistência à pressão exercida. Como resultado, tais animais apresentaram altos valores de limiar de retirada, que não condisseram com o que pôde ser clinicamente observado.

5.5 Avaliação da neurotoxicidade

5.5.1 Efeitos do meloxicam SA sobre a função clínica neurológica

Nenhum dos 27 ratos incluídos no estudo apresentou qualquer distúrbio comportamental ou alteração nas três funções neurológicas analisadas (habilidade de

andar, flexão do membro pélvico e sensação cutânea) durante o período de avaliação (Tabela 2). Contudo, em cada um dos grupos houve a ocorrência de um animal cuja urina apresentou coloração avermelhada, sugerindo a presença de sangue (Figura 11). Tal constatação se deu no dia 1, nos ratos do GI e do GIII, e no dia 10, no rato do GII, entretanto em nenhum dos animais veio acompanhada de outras alterações clínicas ou neurológicas. Exames detalhados para confirmação do conteúdo urinário não foram realizados, contudo em todos os três casos, a alteração teve resolução espontânea, e no dia seguinte já não eram mais constatados sinais da sua ocorrência.

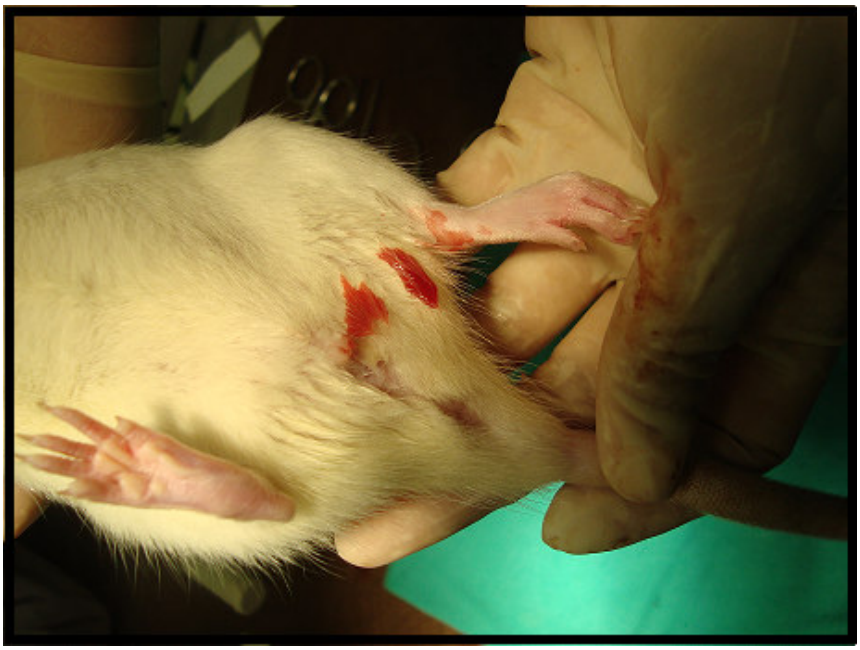

Figura 11 – Urina com coloração avermelhada em animal que recebeu implantação de cânula SA, sugerindo a ocorrência de hematúria.

Tabela 2 – Valores médios dos escores de avaliação neurológica e número absoluto de animais apresentando sugerida hematúria nos diferentes grupos de ratos submetidos à administração de solução salina (GI) ou meloxicam (GII), ou somente implantação de cânula SA (GIII).

	GI	GII	GIII
Habilidade de andar	0	0	0
Flexão do membro pélvico	0	0	0
Sensação cutânea	0	0	0
Hematúria	1	1	1

5.5.2 Efeitos do meloxicam sobre as características histopatológicas da medula espinhal

Para avaliação dos efeitos dos diferentes tratamentos sobre a apresentação histopatológica da ME, três segmentos espinhais foram definidos e analisados quanto à presença de alterações: cervical, torácico e lombossacro. Alterações macroscópicas da ME não foram observadas durante sua extração.

A administração do meloxicam na dose de 30µg.animal^{-1} não resultou em efeitos tóxicos sobre as características histológicas da medula espinhal, não havendo diferenças estatísticas entre os diferentes grupos em relação às lesões observadas.

Tabela 3 – Grau de lesão nos diferentes segmentos medulares e resultados dos testes de comparação entre os grupos de ratos submetidos à administração de solução salina (GI), meloxicam (GII) ou à implantação de cânula SA (GIII).

Variável	GI		GII				Total		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Lesão Cervical									0,383
ausente	2	22,2	2	22,2	2	22,2	6	22,2	
leve	1	11,1	2	22,2	5	55,6	8	29,6	
moderada	3	33,3	4	44,4	1	11,1	8	29,6	
severa	3	33,3	1	11,1	1	11,1	5	18,5	
Lesão Torácica									0,748
ausente	1	11,1	2	22,2	4	44,4	7	25,9	
leve	5	55,6	3	33,3	2	22,2	10	37,0	
moderada	3	33,3	4	44,4	2	22,2	9	33,3	
severa	0	0,0	0	0,0	1	11,1	1	3,7	
Lesão Lombossacra									0,692
ausente	5	55,6	7	77,8	6	66,7	18	66,7	
leve	3	33,3	1	11,1	2	22,2	6	22,2	
moderada	1	11,1	1	11,1	0	0,0	2	7,4	
severa	0	0,0	0	0,0	1	11,1	1	3,7	
Total	**9**	**100**	**9**	**100**	**9**	**100**	**27**	**100**	

Resultado do teste Kruskal-Wallis

Tabela 4 – Número de lesões leves, moderadas ou severas e resultados dos testes de comparação entre os grupos de ratos submetidos à administração de solução salina (GI), meloxicam (GII) ou somente implantação de cânula SA (GIII).

Variável	GI		GII		GIII		Total		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Número de lesões leves									0,680
0	3	33,3	5	55,6	3	33,3	11	40,7	
1	4	44,4	2	22,2	4	44,4	10	37,0	
2	1	11,1	2	22,2	1	11,1	4	14,8	
3	1	11,1	0	0,0	1	11,1	2	7,4	
Número de lesões moderadas									0,163
0	3	33,3	3	33,3	7	77,8	13	48,1	
1	5	55,6	4	44,4	1	11,1	10	37,0	
2	1	11,1	1	11,1	1	11,1	3	11,1	
3	0	0,0	1	11,1	0	0,0	1	3,7	
Número de lesões severas									0,452
0	6	66,7	8	88,9	8	88,9	22	81,5	
1	3	33,3	1	11,1	0	0,0	4	14,8	
3	0	0,0	0	0,0	1	11,1	1	3,7	
Total	**9**	**100**	**9**	**100**	**9**	**100**	**27**	**100**	

Resultado do teste Kruskal-Wallis

As Tabelas 3 e 4 demonstram que nem o grau de severidade das lesões, tampouco o número de lesões leves, moderadas ou severas diferiram estatisticamente entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

Tabela 5 – Presença de lesões severas em cada segmento medular e resultados dos testes de associação em ratos submetidos à administração de solução salina (GI), meloxicam (GII) ou à implantação de cânula SA (GIII).

Variável	GI		GII		GIII		Total		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Lesão severa Cervical									0,395
não	6	66,7	8	88,9	8	88,9	22	81,5	
sim	3	33,3	1	11,1	1	11,1	5	18,5	
Lesão severa Torácica									0,321
não	9	100,0	9	100,0	8	88,9	26	96,3	
sim	0	0,0	0	0,0	1	11,1	1	3,7	
Lesão severa Lombossacra									0,321
não	9	100,0	9	100,0	8	88,9	26	96,3	
sim	0	0,0	0	0,0	1	11,1	1	3,7	
Total	**9**	**100**	**9**	**100**	**9**	**100**	**27**	**100**	

Resultado do teste exato de Fisher

Tabela 6 – Presença de lesões de qualquer severidade em cada segmento medular e resultados dos testes de associação entre os grupos de ratos submetidos à administração de solução salina (GI), meloxicam (GII), ou somente implantação de cânula SA (GIII).

Variável	GI		GII		GIII		Total		p
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Lesão Cervical									>0,999
não	2	22,2	2	22,2	2	22,2	6	22,2	
sim	7	77,8	7	77,8	7	77,8	21	77,8	
Lesão Torácica									0,256
não	1	11,1	2	22,2	4	44,4	7	25,9	
sim	8	88,9	7	77,8	5	55,6	20	74,1	
Lesão Lombossacra									0,602
não	5	55,6	7	77,8	6	66,7	18	66,7	
sim	4	44,4	2	22,2	3	33,3	9	33,3	
Total	**9**	**100**	**9**	**100**	**9**	**100**	**27**	**100**	

Resultado do teste exato de Fisher

Pelas Tabelas 5 e 6, observa-se que a presença de lesões de qualquer severidade não esteve estatisticamente associadas a qualquer um dos grupos experimentais nos diferentes segmentos medulares avaliados ($p > 0,05$). Contudo, a análise histopatológica permitiu observar-se que em todos os animais que apresentaram lesões severas da ME, exceto um, tais alterações ocorreram em um local bem delimitado, junto à região adjacente à cânula SA. Essas alterações foram caracterizadas pela ocorrência de grave degeneração Walleriana, hemorragias e malácia com presença de células de Gitter, por exemplo, sugerindo compressão medular por presença da cânula. A presença de um espessamento meningeal, formando um tecido cicatricial envolvendo a cânula, foi constatada em alguns dos animais experimentais. As alterações medulares histológicas encontram-se ilustradas pela Figura 12.

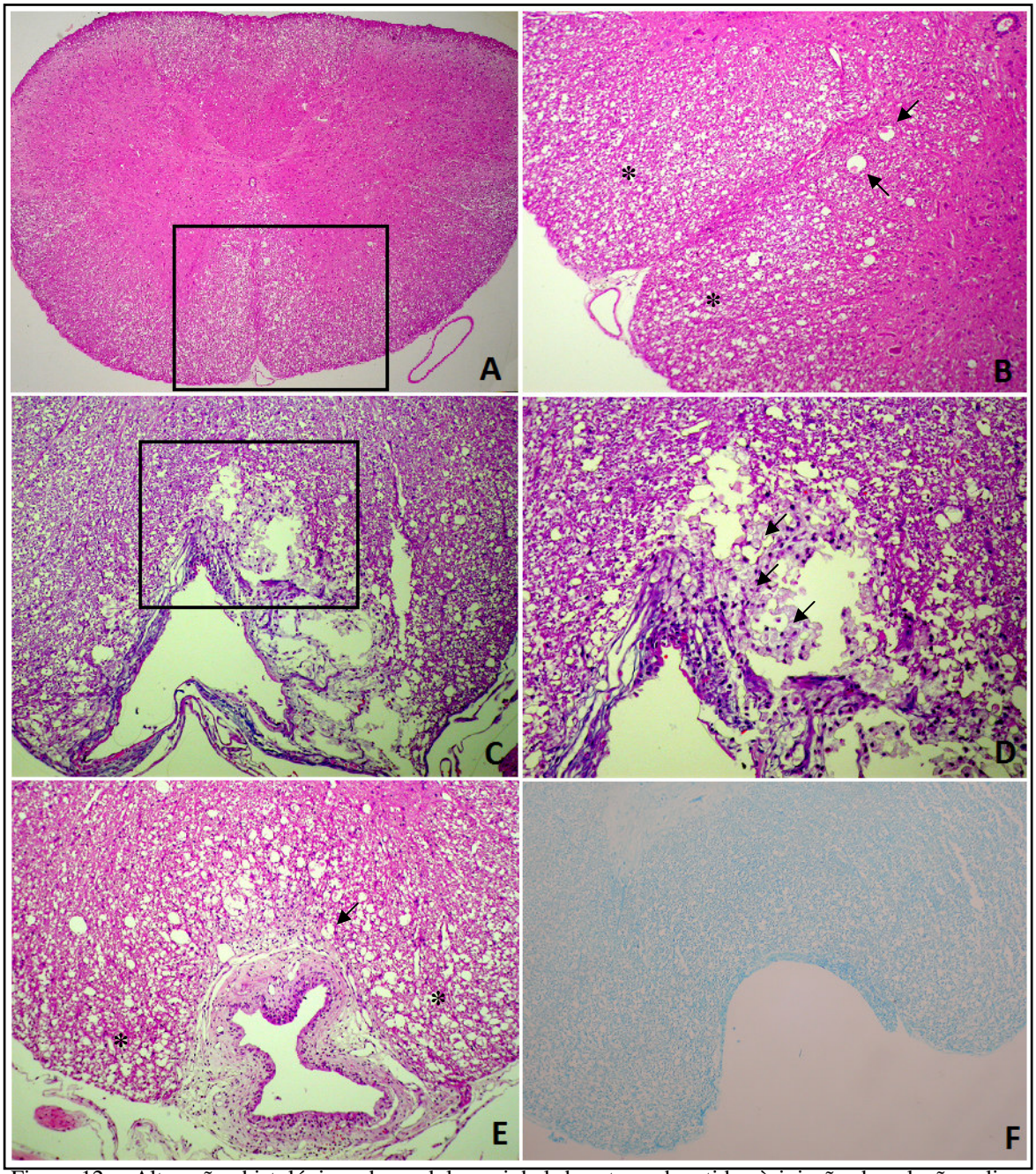

Figura 12 – Alterações histológicas da medula espinhal de ratos submetidos à injeção de solução salina, meloxicam ou somente manutenção crônica da cânula SA. **A.** Segmento medular cervical com área focal de degeneração Walleriana em corno ventral. Coloração de hematoxilina e eosina (Objetiva 04). **B.** Detalhe da Figura A mostrando degeneração walleriana (asteriscos) e presença de esferóides axonais (setas). Coloração de hematoxilina e eosina (Objetiva 10). **C.** Segmento medular cervical com foco de malácia e degeneração Walleriana em torno da região de inserção da cânula. Coloração de hematoxilina e eosina (Objetiva 10). **D.** Detalhe da Figura C mostrando grande quantidade de células de Gitter (setas) próximo à região de inserção da cânula. Coloração de hematoxilina e eosina (Objetiva 10). **E.** Segmento medular cervical com área de espessamento meningeal por inserção da cânula. Presença de degeneração Walleriana (asteriscos) e esferóides axonais (seta). Coloração de hematoxilina e eosina (Objetiva 10). **F.** Segmento medular torácico com perda de mielina em torno da região de inserção da cânula, demonstrada através da coloração de Luxol *fast blue* (Objetiva 10).

Tabela 7 – Descrição do escore de lesão medular total (LMT) segundo os diferentes grupos e dias de eutanásia, e resultado das comparações.

Variável	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Grupo					0,524
GI	3	0	7	9	
GII	3	0	6	9	
GIII	2	0	9	9	
Data Eutanásia (dia)					0,163
1	3	0	6	9	
7	3	0	7	9	
14	4	1	9	9	
Total	**3**	**0**	**9**	**27**	

Resultado do teste Kruskal-Wallis

A observação da Tabela 7 mostra que não houve diferença estatística entre o LMT dos três grupos experimentais (p = 0,524), bem como entre os diferentes períodos de eutanásia (p = 0,163). Contudo, a Tabela 8 demonstra que a região medular cervical apresentou as lesões com maiores graus de severidade (p < 0,001) quando todos os animais foram analisados de forma geral, independentemente do grupo experimental.

Tabela 8 – Descrição do grau de severidade da lesão e resultados das comparações entre cada segmento medular dos animais de todos os grupos experimentais.

Grau da lesão	Local						p
	Cervical		Torácica		Lombossacra		
	n	%	n	%	n	%	
ausente	6	22,2	7	25,9	18	66,7	**<0,001**
leve	8	29,6	10	37,0	6	22,2	
moderada	8	29,6	9	33,3	2	7,4	
severa	5	18,5	1	3,7	1	3,7	

Resultado do teste de Friedman

5.5.3 Efeitos do meloxicam SA sobre a variação do peso corporal

Para avaliação do efeito dos tratamentos sobre o peso corporal, os animais dos três grupos foram analisados quanto à variação de peso em dois intervalos: entre 0 e 7 dias, e entre 7 e 14 dias.

Os efeitos dos tratamentos sobre a variação do ganho de peso não foram estatisticamente diferentes entre os grupos, pois todos apresentaram a mesma redução média de peso ao longo do tempo de avaliação. Independentemente do grupo, uma diminuição média de 23,91g do dia 7 em relação ao peso basal pôde ser constatada ($p = 0,013$). O Apêndice C demonstra os pesos corporais dos animais dos diferentes grupos ao longo dos períodos de avaliação.

A Figura 13 demonstra os perfis médios e respectivos erros padrões dos pesos de acordo com os grupos.

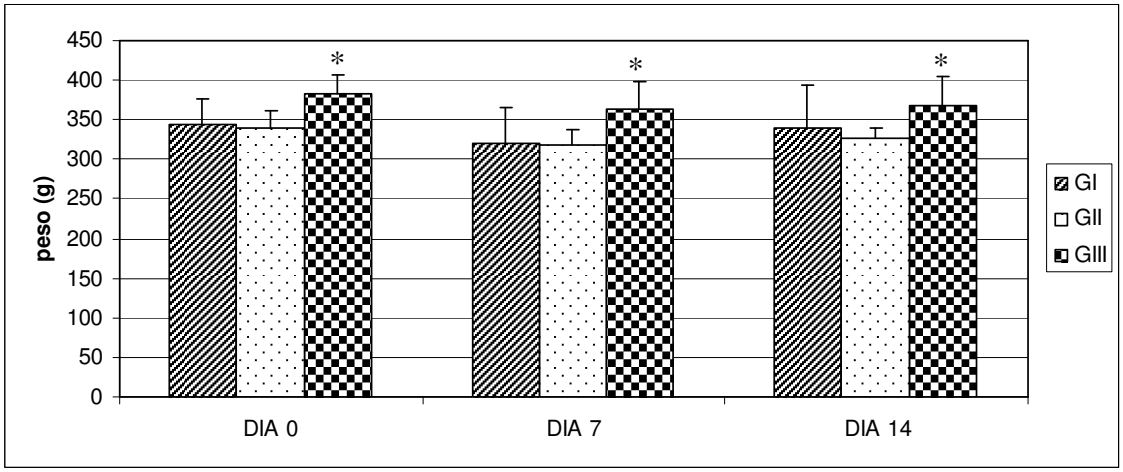

Figura 13 – Média e erro padrão do peso corporal (g) de animais submetidos à administração de solução salina (GI), meloxicam (GII) ou somente implantação de cânula SA (GIII) em 0 (basal), 7 e 14 dias de avaliação. *$p < 0,05$

O GIII, composto por ratos que receberam somente a implantação da cânula, apresentou peso médio estatisticamente maior que os demais grupos ($p < 0,05$), independentemente do momento de avaliação.

6 DISCUSSÃO

Segundo Macphail (1990), a continuidade biológica entre espécies representa a base da ciência biomédica moderna, tornando o emprego de modelos animais indispensável para a avaliação de uma variedade de substâncias. São, portanto, cruciais na pesquisa de doenças bem como na identificação e avaliação de tratamentos profiláticos e terapêuticos. O autor afirma, ainda, que o uso de modelos animais permite flexibilidade, precisão e reprodutibilidade, sendo essas grandes vantagens em relação a outros modelos experimentais. No presente estudo, tais características puderam ser fielmente observadas, e o emprego do rato como modelo para a avaliação dos efeitos antinociceptivos mecânicos e neurotóxicos do meloxicam SA foi bem sucedido.

Embora as pesquisas experimentais de nocicepção ou neurotoxicidade eventualmente empreguem outras espécies animais, como coelhos (READY et al., 1985; MALINOVSKY et al., 1993; WANG et al., 1995; LIM et al., 2003; YAMASHITA et al., 2003; VRANKEN et al., 2006), camundongos (PINARDI et al., 2003; PINARDI et al., 2005; KIMURA & KONTANI, 2009) e cobaios (GUEVARA-LÓPEZ et al., 2006; VASCONCELOS FILHO, 2008), o rato continua representando a espécie mais amplamente utilizada. Dentre as características observadas no presente estudo, o baixo custo operacional, a facilidade de manipulação e a existência de uma vasta literatura referencial mostraram ser essa a espécie mais indicada para as análises necessárias. Essa observação é corroborada por Malkmus & Yaksh (2004), que afirmaram ser o rato o modelo primário nas investigações de substâncias pela via SA.

Adicionalmente à escolha do modelo animal, a opção pela técnica anestésica utilizada foi de fundamental importância para a correta realização da pesquisa experimental. De acordo com Fantoni & Otsuki (2004), uma técnica inapropriada pode confundir os resultados obtidos, prolongar a recuperação ou até mesmo impossibilitar a consumação da pesquisa. Assim sendo, é essencial o emprego de técnicas anestésicas que confiram, além de contenção química adequada, hipnose e analgesia, a fim de que os animais não vivenciem experiências de dor, e permitindo ainda, se a pesquisa exigir, rápida e suave recuperação anestésica. No presente estudo, tais afirmações puderam ser confirmadas, visto que diferentes técnicas anestésicas foram testadas e avaliadas durante o estudo piloto realizado pelos pesquisadores, com resultados variáveis sobre diferentes parâmetros. O emprego de fármaco opióide associado a anestesia inalatória com isoflurano, por exemplo, permitiu a manutenção dos parâmetros respiratórios e a rápida

recuperação anestésica, mas não proporcionou analgesia adequada para a abordagem do espaço SA. Adicionalmente, a profundidade anestésica apropriada só era alcançada após vários minutos de administração ininterrupta do anestésico inalatório, elevando o tempo operatório.

A administração IP de cetamina (100mg.kg^{-1}) e xilazina (10mg.kg^{-1}), por outro lado, atendeu às exigências necessárias ao procedimento de implantação da cânula SA, corroborando a afirmação de Lumb & Jones (1996) de que essa combinação é satisfatória para anestesia cirúrgica em ratos. Adicionalmente, para Gaertner et al. (2008), a associação desses fármacos é extremamente útil por permitir indução suave, fornecer analgesia residual após o curto período anestésico (15-30 minutos) e promover relaxamento muscular, todas essas vantagens que puderam ser constatadas nesse ensaio experimental. Tais características contribuem para que essa associação seja a técnica escolhida para implantação de cânulas SA em ratos em diferentes estudos (DOBOS et al., 2003; SHI et al., 2004)

Embora Fantoni & Otsuki (2004) tenham afirmado que os animais de laboratório são indivíduos difíceis de serem anestesiados – em vista da proximidade entre doses anestésicas e letais e da complicada manutenção de planos anestésicos que não resultem em depressão cardiovascular e respiratória –, apenas três animais morreram em consequência da anestesia. Esse número foi considerado aceitável, dada a limitada monitoração trans-operatória e a exigência de um posicionamento desfavorável à manutenção da qualidade respiratória dos animais. No que se refere a essa última variável, ela pareceu ser fortemente dependente da necessidade de flexão do pescoço dos animais durante o procedimento de implantação da cânula. Tal dificuldade também foi vivenciada por Asato et al. (2001), que relataram a ocorrência de óbitos por problemas respiratórios em seu estudo, mesmo com o uso de anestesia inalatória. Não é possível, entretanto, minimizar-se a importância dos efeitos depressores dos fármacos anestésicos. Em estudo de Wixson et al. (1987), por exemplo, a administração IP de cetamina e xilazina nas doses de 60 e 7,5mg.kg^{-1}, respectivamente, elevou em 38% a pressão parcial de dióxido de carbono arterial ($PaCO_2$) e reduziu em 23-24% a pressão parcial de oxigênio arterial (PaO_2). A administração dos fármacos nas doses de 50 e 5mg.kg^{-1}, contudo, não resultou em efeitos similares, demonstrando que eles parecem ocorrer de forma dose-dependente. Visto que o presente estudo implicou na administração de doses ainda superiores a essas, é factível crer em uma contribuição do protocolo anestésico para certo grau de depressão respiratória.

Entretanto uma vez que os sinais de depressão respiratória grave – manifestada na forma de cianose e/ou redução acentuada da frequência respiratória – foram percebidos nos animais do estudo piloto, optou-se pelo fornecimento de oxigênio a 100% a todos os ratos da presente pesquisa, durante o transcorrer do procedimento (por máscara) e no pós-operatório imediato (em incubadora). Em vista disso, é possível crer que o número reduzido de óbitos possa decorrer da adoção de tais medidas.

Dentre as dificuldades relacionadas à seleção da técnica anestésica, a necessidade de escolha de fármacos que interferissem o mínimo possível nos resultados obtidos nas diferentes avaliações – especialmente aquelas relacionadas à antinocicepção – emergiu como uma questão de extrema relevância. Fantoni & Otsuki (2004) confirmaram essa dificuldade, afirmando que alcançar esse objetivo geralmente constitui tarefa trabalhosa, e uma cuidadosa revisão dos fármacos e técnicas deve ser realizada na tentativa de minimizar a interação entre protocolo anestésico e modelo experimental.

Dado que o efeito analgésico da cetamina está ligado à sua atividade como antagonista de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (WONG & KEMP, 1991), e está bem estabelecido na literatura o envolvimento de tais receptores na hiperalgesia induzida pela carragenina (REN et al., 1992), uma das grandes preocupações do presente estudo foi a minimização de tais efeitos sobre os possíveis resultados obtidos. Para isso, duas medidas foram adotadas: o estabelecimento de um intervalo mínimo de 24 horas entre a indução da anestesia e os testes de avaliação da antinocicepção, e a realização de protocolos anestésicos similares a ambos os grupos avaliados. Dessa forma, procurou-se reduzir a chance de que ações residuais da quetamina pudessem exercer efeitos sobre a nocicepção mas que caso ocorressem, fossem semelhantes em ambos os grupos de avaliação. Por conseguinte, considerando que o fornecimento de fármacos anestésicos foi cuidadosamente similar nos dois grupos avaliados para antinocicepção, é possível afirmar que as diferenças constatadas foram resultantes dos variados tratamentos utilizados.

No campo experimental, a primeira descrição com o uso crônico de cateter subaracnóideo no rato foi feita por Yaksh & Rudy, em 1976. Esse estudo é até os dias atuais amplamente empregado quando da avaliação de substâncias pela via SA, servindo de base para a técnica utilizada no presente experimento. Outros trabalhos (AKERMAN, 1985; RENELLA & HUSSEIN, 1986; WANG et al., 1991; SAKURA et al., 1996; JASMIN & OHARA, 2001; LEBEDEV et al., 2004; MALKMUS & YAKSH,

2004; NIROGI et al., 2009; PEGG et al., 2010), contudo, agregaram informações e serviram como referências para as adaptações necessárias à realização do procedimento em nossas condições experimentais.

Embora o procedimento de colocação da cânula SA tenha mostrado ser relativamente fácil e de rápida realização, a delicadeza e importância das estruturas envolvidas provaram ser fundamental o treinamento prévio em estudo piloto, familiarizando a equipe com a anatomia da região e a técnica empregada. Apesar de diferentes trabalhos terem relatado técnicas de implantação torácica (POON et al., 2005) ou lombar (WANG et al., 1991; STØRKSON et al., 1996; XU & ZHANG, 2009) para cânulas SA, a escolha pela abordagem cisternal se mostrou satisfatória, especialmente no que se refere à sua rapidez de realização. Contudo, tal abordagem implicou em um elevado número de animais excluídos do estudo por apresentarem *déficits* neurológicos no período posterior à implantação da cânula, comprovando a afirmação de Wang et al. (1991) de que sua inserção através da membrana atlantooccipital, percorrendo às cegas todo o comprimento da coluna vertebral, não ocorre sem risco de lesão às estruturas envolvidas. Assim, é possível acreditar-se que a opção pela técnica lombar poderia ser responsável por uma redução considerável na ocorrência de tais lesões, e consequentemente no número de animais excluídos do estudo, porém com acentuada demanda de tempo e elevação dos custos finais, uma vez que geralmente envolve laminectomia vertebral (COSTA et al., 1991).

Assim, corroborando nossos achados, a literatura tem demonstrado que a técnica original de inserção da cânula através da membrana atlantoocipital, avançando-a até o espaço lombar, apresenta diversas desvantagens, como dano ou compressão da ME, lesão das raízes nervosas e hemorragia SA, estando associada a taxas relativamente altas de mortalidade e deficiência neurológica (YAKSH & RUDY, 1976; STØRKSON et al., 1996). Outras intercorrências, como penetração do cateter na ME (ASATO et al., 2001), perda de peso (SERPELL et al., 1993), alteração da nocicepção (SERPELL et al., 1993; PRADO, 2003) e redução dos opióides hipotalâmicos (ROVATI et al., 1988) também são relatadas com o uso da abordagem cisternal.

Em adição à técnica de abordagem do espaço SA, as próprias características físicas da cânula empregada parecem ter sido outro fator determinante para o alto índice de alterações neurológicas. Embora as cânulas de polietileno PE-10 sejam as mais amplamente utilizadas (SHI et al., 2004), seu tamanho varia de acordo com o fabricante. Assim, enquanto a maioria dos estudos (YAKSH & RUDY, 1976; WANG et al., 1991;

TSANG et al., 1997) envolve o emprego de cânulas que medem 0,28mm de diâmetro interno, e 0,61mm de diâmetro externo – ou ainda menores – o presente trabalho utilizou cânulas que possuíam medida interna semelhante, mas apresentavam 0,64mm de diâmetro externo. Em estudo de Tsang et al. (1997), o efeito da alteração de tamanho foi comprovado pela menor ocorrência de paralisia e melhor coordenação motora nos animais que receberam cânulas SA mais finas. Segundo os autores, nesses casos, paralisia ou mesmo a morte do animal podem advir da ocorrência de lesões medulares ou de hemorragias SA, enquanto que os déficits motores geralmente são decorrentes de compressão da ME pela cânula. Tsang et al. (1997) citaram, ainda, a alternativa adotada por alguns autores (YAKSH & RUDY, 1976; AKERMAN, 1985; STØRKSON et al., 1996; ASATO et al., 2001; KIRIHARA et al., 2003), os quais esticaram a cânula antes da implantação. Quando a cânula é esticada de forma homogênea, essa modificação reduz acentuadamente os danos à medula por produzir uma superfície cilíndrica e suave. Todavia, quando isso não ocorre, criam-se irregularidades na sua superfície, podendo inclusive elevar o risco de trauma a ME.

Segundo Asato et al. (2001), os procedimentos de implantação através da membrana atlantooccipital podem apresentar alguns problemas metodológicos afetando o posicionamento da cânula e a dispersão SA da substância. Primeiramente, o tamanho da cânula pode ser um fator crítico, visto que quanto maior seu diâmetro e mais estreito o espaço SA, mais difícil será a implantação. Adicionalmente a isso, o tamanho do rato constitui variável importante, uma vez que animais menores apresentam espaços subaracnóides mais estreitos, dificultando a passagem da cânula. De fato, relatos têm indicado que a compressão da ME pode ocorrer em toda a extensão da cânula, com subsequente lesão à medula e nervos espinhais (YAKSH & RUDY, 1976; TSANG et al., 1997). De acordo com Hebel & Stromberg (1986), o segmento torácico do canal vertebral em um rato com 300g de peso corporal possui em média 3,68mm de diâmetro, enquanto que a correspondente ME possui em média 3,08mm de diâmetro, deixando assim apenas 0,60mm para o espaço SA. Considerando o tamanho da cânula utilizada (0,64mm de diâmetro externo), é possível imaginar que tal fator tenha contribuído para a ocorrência de compressão medular e déficit motor.

No que se refere à marcação das cânulas, optou-se pelo emprego da tinta esmalte, seguindo a técnica adotada por Costa et al. (1991), que não verificaram sinais de reação tecidual a esse produto. Os autores testaram, ainda, outros materiais, como

mononylon e acrílico polimerizável dental, mas eles foram rejeitados por promoverem a obstrução do pertuito do cateter após o endurecimento.

O uso da carragenina – um polissacarídeo sulfatado derivado de algas – como agente indutor de inflamação foi introduzido por Winter et al. em 1962, tornando-se, desde então, um modelo experimental de dor inflamatória comumente utilizado em estudos e amplamente descrito na literatura (DI ROSA & SORRENTINO, 1970; CRUNKHORN & MEACOCK, 1971; GREEN et al., 1971; GARCIA LEME et al., 1973; SALVEMINI et al., 1996; POSADAS et al., 2004). Diversos mediadores encontram-se envolvidos na resposta inflamatória induzida pela carragenina, participando do aumento da permeabilidade vascular e consequente edema, dentre eles PGs, histamina, serotonina e bradicinina (GARCIA LEME et al., 1973; POSADAS et al., 2004). No que cabe às PGs, elas atuam potencializando os efeitos microvasculares e álgicos de outros mediadores (FERREIRA, 1972; WILLIAMS & MORLEY, 1973). Assim, embora não sejam agentes álgicos diretos como o são a bradicinina, a substância P e a histamina, elas induzem um estado de hiperalgesia no qual estímulos previamente não-dolorosos passam a ser percebidos como dolorosos, tanto em modelos animais quanto em humanos (FERREIRA, 1972).

A efetividade dos AINEs convencionais, dos inibidores da COX-2 e dos anticorpos monoclonais anti-PGE_2 como agentes antiinflamatórios nos modelos experimentais utilizando a carragenina encontra-se atualmente bem descrita na literatura (ZHANG et al., 1997; RENDEAU et al., 2001; FRANCISCHI et al., 2002). Suas ações foram tradicionalmente atribuídas à inibição das PGs periféricas, as quais exercem importante papel na sensibilização dos nociceptores no sítio de lesão (KELLY et al, 2001), uma vez que a injeção intraplantar de carragenina induz um significativo aumento na expressão de COX-2, bem como na produção de PGE_2 (NANTEL et al., 1999). As quantidades relativas de cada isoforma que são expressas nos diferentes tecidos, contudo, variam e podem ser moduladas sob condições patológicas. Assim, contrastando com outros órgãos, o cérebro normal do rato, bem como a medula espinhal expressam mais COX-2 do que COX-1 (MARTIN et al., 2007) e dados confirmam seu papel no processamento sensorial da dor (VANEGAS & SCHAIBLE, 2001). Desse modo, uma série de evidências experimentais sugere atualmente que os AINEs exercem sua ação analgésica também por atividade sobre o SNC, adicionalmente à sua reconhecida ação periférica (MARTIN et al., 2007).

Diversos fármacos têm sido administrados por via espinhal na tentativa de comprovar tal mecanismo, e a ausência de efeitos consistentes do meloxicam SA sobre a nocicepção induzida no modelo experimental utilizado vem contra os achados de outros autores, que reportam atividade antinociceptiva após o uso espinhal de outros AINEs (WANG et al., 1992; MALMBERG & YAKSH, 1992a; WANG et al., 1995; PARRIS et al., 1996; MASUE et al., 1999; FRANCISCHI et al., 2002; PINARDI et al., 2003; PINARDI et al., 2005; MIRANDA & PINARDI, 2009; EISENACH et al., 2010).

Ressalta-se, contudo, que embora uma variedade de trabalhos pesquise o poder antinociceptivo dos inibidores da COX-2 administrados por via SA, estudos abordando especificamente os efeitos do meloxicam são ainda escassos. Esses trabalhos já foram capazes de demonstrar, entretanto, um efeito inibitório sobre o fenômeno de *wind-up in vitro* (LOPEZ-GARCIA & LAIRD, 1998), bem como sobre a nocicepção induzida pela capsaicina ou formalina (SANTOS et al., 1998). Adicionalmente, um efeito analgésico sinérgico com a morfina foi demonstrado após sua administração SA em animais com dor visceral experimental (PINARDI et al., 2005). Kimura & Kontani (2009), por exemplo, utilizando dose semelhante à que foi empregada no presente estudo ($30\mu g.animal^{-1}$), pesquisaram os efeitos antialodínicos do meloxicam SA. Os autores, contudo, utilizaram um modelo de dor neuropática experimental em camundongos diabéticos, diferindo do modelo de dor inflamatória desta pesquisa. Os efeitos do fármaco, entretanto, foram demonstrados com a dose empregada, o que não ocorreu neste estudo.

Observando-se atentamente os dados apresentados na Figura 10, todavia, é possível perceber que o grupo submetido à administração do meloxicam apresentou valores médios do Δ do limiar de retirada inferiores àqueles mostrados pelo grupo que recebeu a solução salina, durante todos os momentos de avaliação entre 45 e 165 minutos. Fisiologicamente falando, os animais submetidos à ação do meloxicam SA suportaram, na média, maiores forças mecânicas sobre a região intraplantar. Embora essa diferença não tenha sido demonstrada estatisticamente, ela pode levar a crer na existência de uma tendência à obtenção de valores mais baixos, tendo sido sua significância estatística impossibilitada por fatores adicionais, como o tamanho da amostra. Essa suposição é reforçada pela observação clínica de sensibilidade dolorosa exagerada em dois animais que receberam solução salina, o que não ocorreu em nenhum dos animais tratados com meloxicam.

A inflamação gerada pela aplicação intraplantar de carragenina se caracteriza por mostrar um comportamento bifásico em relação ao edema. A fase precoce (0-1h) tem sido atribuída à liberação de histamina, 5-hidroxitriptamina e bradicinina, de modo que a eficácia dos AINEs nesse período tem sido questionada. Na fase tardia (1-6h), por outro lado, uma elevada produção de PGs tem sido tem sido verificada (DI ROSA & SORRENTINO, 1970). A hiperalgesia, contudo, parece se desenvolver em paralelo com a elevação dos níveis espinhais de COX-2 e, segundo Hilário et al. (2006), seu pico só ocorre após 4 horas da injeção de carragenina. Observando a Figura 10, entretanto, é possível perceber que os efeitos do meloxicam sobre a hiperalgesia ocorreram justamente no período anterior às 4 horas de avaliação, com valores significativamente elevados do Δ do limiar de retirada após 165 minutos da administração, contrastando com tais afirmações.

Esse comportamento da curva de resposta, todavia, também foi observado por Dirig et al. (1998) que, usando o modelo da carragenina, relataram efeitos anti-hiperalgésicos térmicos quando da administração SA do SC58125 – um inibidor seletivo da COX-2 – somente durante os 170 minutos iniciais da avaliação. Visto que a hiperalgesia térmica tem mostrado ser similarmente mediada pela ação da COX-2 espinhal (YAMAMOTO & NOZAKI-TAGUCHI, 1997), estudos que caracterizem o padrão de expressão medular da COX-2 na inflamação induzida pela carragenina, até então aparentemente inexistentes, poderão elucidar tais observações.

Um significativo aumento na intensidade da hipernocicepção, caracterizado pela elevação do Δ do limiar de retirada, especialmente nas avaliações com 210 e 240 minutos, foi observado em ambos os grupos experimentais. Tais constatações podem ser explicadas pelas afirmações de Le Bars et al. (2001), segundo as quais a repetição do estímulo mecânico pode produzir uma elevação na sensibilidade da área estimulada. A administração do meloxicam, portanto, também não foi capaz de impedir esse aumento da hipernocicepção com o transcorrer do tempo.

Dentre os diferentes fatores que podem ter influenciado a obtenção dos presentes resultados, o estabelecimento de uma dose adequada surgiu como uma necessidade essencial cuja importância pode ter sido decisiva para os dados aqui demonstrados. Atualmente, os escassos trabalhos envolvendo o meloxicam por via SA envolvem protocolos de administração distintos daquele preconizado nesse estudo, como técnicas de infusão contínua (TAKEDA et al., 2005) ou sua associação com opióides (PINARDI et al., 2005). A necessidade de determinação de uma dose capaz de demonstrar efeitos

consistentes, ou mesmo a ausência de tais efeitos, se baseou na extrapolação dos resultados obtidos em tais estudos, com sua adequação às necessidades desse trabalho. Assim, tomando por base as pesquisas de Kimura & Kontani (2009), que obtiveram resultados satisfatórios com o uso de 30μg.animal^{-1} de meloxicam SA sobre a dor neuropática experimental em animais diabéticos, a utilização de dose semelhante foi preconizada, de forma a observar seus efeitos sobre a hiperalgesia inflamatória.

A dor neuropática, contudo, é uma síndrome complexa que envolve teorias inflamatórias e imunes ainda pouco esclarecidas, e cuja hiperalgesia resulta tanto do comprometimento de tecidos neurais quanto não-neurais, estando associada à ativação de fibras Aβ, além das fibras Aδ (KRAYCHETE et al., 2008). Nos animais diabéticos, ela é decorrente de uma polineuropatia ainda não completamente compreendida, mas na qual se acredita estarem envolvidas as ações das PGs, sensibilizando o sistema nociceptivo tanto em sítios centrais quanto periféricos, especialmente na ME, o que leva à crença de uma possível efetividade dos AINEs espinhais em tal enfermidade (KIMURA & KONTANI, 2009). Contudo, a complexidade do sistema nociceptivo tem demonstrado que diferentes vias sensoriais são ativadas após alterações mínimas na natureza do processo doloroso (MILLAN, 1999), levando a acreditar que doses diferenciadas de um mesmo fármaco possam ser necessárias para supressão das dores de diferentes origens. Tal possibilidade pode ser prontamente cogitada no presente estudo, visto que uma dose capaz de controlar a hiperalgesia neuropática não obteve os mesmos resultados sobre aquela de origem inflamatória. Fica assim demonstrada a necessidade de pesquisas futuras com diferentes doses do fármaco.

A importância de fatores adicionais influenciando os resultados em estudos de antinocicepção, porém, tem sido comprovada de forma crescente ao longo dos anos. Em sua grande maioria, envolvem a manutenção da própria cânula no espaço SA, podendo ser ela responsável por alterar a detecção da atividade antinociceptiva do fármaco administrado (PRADO, 2003). Shih et al. (2004) perceberam que a manutenção de uma cânula PE-10 no espaço SA alterou consideravelmente os potenciais evocados somatosensoriais (PESS), os quais se correlacionam com a nocicepção. Os autores constataram que a cateterização SA com uma cânula PE-10 prejudicou seriamente a elevação nos PESS induzida pelo teste da formalina, e que esse fato pode prejudicar sua distinção dos efeitos antinociceptivos reais.

Em estudo de Prado (2003), a importância dessas observações pôde ser comprovada pelo menor poder antinociceptivo da morfina SA administrada em ratos

que possuíam cânula SA cronicamente implantada, quando comparada à sua administração aguda por punção. Segundo o autor, as alterações medulares produzidas pela presença crônica da cânula SA podem produzir modificações na resposta comportamental de roedores à administração espinhal de fármacos.

Outra influência da implantação crônica de cânulas SA advém da necessidade de alojamento individual dos animais, situação que pode originar a aparição de uma síndrome de isolamento social, descrita por Hatch em 1965. Essa condição pode diminuir a confiabilidade de testes comportamentais, reduzindo ou aumentando a resposta nociceptiva (PANKSEPP, 1980).

Na presente pesquisa, as avaliações antinociceptivas foram realizadas em um período de 24 horas após a implantação da cânula, levando a crer em uma minimização dos efeitos comportamentais decorrentes do isolamento. Contudo, apesar de até o momento não existirem alternativas práticas e amplamente caracterizadas na literatura, a importância de tais aspectos não pode ser subestimada. Por outro lado, a precocidade da avaliação após a implantação da cânula pode ter exercido alguma influência sobre os resultados alcançados. Assim, alguns autores sugerem um período de quatro a sete dias para recuperação após a cirurgia, a fim de se alcançar a completa recuperação da função motora (KIRIHARA et al., 2003; SAKURA et al., 2005).

Quando abordada a administração espinhal de substâncias, a pesquisa de possíveis efeitos neurotóxicos mostra-se uma questão primordial, de modo que ações deletérias sobre o SNC podem ser decisivas em impedir seu uso clínico em pacientes. Nesses casos, o objetivo inicial dos testes consiste em determinar se o sistema nervoso é afetado ou não por uma determinada substância cujos dados toxicológicos ainda não existem. Todavia, potenciais riscos neurológicos são difíceis de avaliar em decorrência da complexidade do sistema nervoso (U.S. CONGRESS, 1990).

Distúrbios comportamentais podem surgir como um dos primeiros indicativos de lesão do sistema nervoso. Em humanos, essas mudanças se manifestam como alterações que incluem ansiedade, nervosismo, depressão, perdas de memória e apetite. Em casos graves, podem ocorrer comportamentos bizarros, com delírio, alucinações, convulsões ou mesmo a morte (U.S. CONGRESS, 1990). Em ratos, sinais como redução da atividade e perda de peso podem ser sugestivas de neurotoxicidade (CHOI et al., 2005).

Nesse estudo, uma redução média do peso corporal de 23,91g ocorreu nos animais experimentais até a data da eutanásia, contudo ela se deveu à implantação e manutenção da cânula no espaço SA. Tal achado é corroborado pelos estudos de Serpell

et al. (1993), Tsang et al. (1997) e Nishiyama et al. (1998), que também relataram perda de peso em animais que receberam a cânula. Todavia, a redução do peso corporal não diferiu estatisticamente entre os diferentes grupos, demonstrando a ausência de efeitos da administração SA do meloxicam sobre sua variação. Esses achados vêm se unir ao trabalho de Takeda et al. (2005), em que ratos recebendo infusão contínua de meloxicam por via SA durante sete dias não apresentaram redução do ganho de peso corporal.

No presente estudo, a observação de pesos corporais médios estatisticamente superiores no GIII em relação aos demais grupos não apresentou uma causa definida, mas acredita-se que possa decorrer de variações resultantes da utilização de animais com diferentes origens. Essa constatação não pareceu exercer qualquer influência sobre os resultados do estudo, visto que a variação do peso corporal ao longo do período de avaliação no GIII não diferiu dos demais grupos experimentais.

A sugerida presença de hematúria em três animais do estudo, embora não tenha sido confirmada por análises laboratoriais, parece se relacionar fortemente com as observações de Meyer et al. (2003). Segundo os autores, ratos submetidos a lesão medular experimental apresentaram alterações histopatológicas da bexiga que já puderam ser constatadas duas horas após o trauma e envolveram mudanças no número de camadas do urotélio, presença de mono e morfonucleados, e alterações vasculares, entre outros achados. A ocorrência das alterações histopatológicas pôde ser verificada durante os quatro dias que corresponderam ao período de avaliação. Contudo, hematúria franca surgiu como um sinal precoce de cistite hemorrágica, ocorrendo nas primeiras 24-48 horas após a lesão, mesmo período constatado em dois dos três animais afetados no presente ensaio experimental.

A ocorrência de alterações urinárias após trauma medular está bem descrita na literatura, tanto no homem (LEONI & RUZ, 2003) quanto em animais (ÖZTEMÜR et al., 2010; YOO & LEE, 2010), e de modo geral recebe o nome de “disfunção neurogênica da bexiga”. Lesões medulares traumáticas podem alterar o centro da micção pontina e, como resultado, ocorrer disfunção na coordenação vesicouretral. Por conseguinte, o dano medular resulta em sérias modificações funcionais no trato urinário inferior, o que favorece a infecção devido à incontinência e ao aumento da pressão intra-vesical. Como resultado, as infecções do trato urinário representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com lesões da ME (LEONI & RUZ, 2003; MEYER et al., 2003). Desse modo, a ocorrência de uma lesão medular

traumática por ocasião da colocação e presença da cânula no espaço SA despontou como principal explicação para a presumida cistite hemorrágica nos referidos animais experimentais.

Entretanto, tem sido sugerido que doenças afetando o SNC possam produzir inflamação neurogênica – cistite hemorrágica – através da ativação de circuitos vesicais centrais em áreas específicas da ME e do tronco cerebral. Pouco se sabe, porém, acerca dos mecanismos através dos quais o SNC pode ativar neurônios sensoriais ou autonômicos para produzir inflamação. Esse processo já foi demonstrado após o dano medular decorrente de infecção viral, a qual incita uma resposta imune mediada pelas células da glia e pelos leucócitos. Assim, tem sido proposto que o desenvolvimento da cistite após lesão medular de etiologia viral possa ser atribuído a essa resposta imune, responsável por ativar os circuitos neurais somáticos e autonômicos (JASMIN et al., 1998).

Evidências demonstradas por DeLeo et al. em 1997, adicionalmente, afirmam que a cateterização SA é capaz de induzir uma robusta ativação neuroimune, manifestada como uma elevação na expressão de marcadores gliais e citocinas específicas, semelhantemente ao que ocorre na doença medular viral. Com base nesses achados, não é inviável sugerir a hipótese de que a cateterização SA por si só possa acarretar em cistite hemorrágica através da ação de mecanismos de ativação neurais similares. Essa teoria é reforçada pela ausência de evidências clínicas, macro e microscópicas de dano medular nesses animais, sugerindo que possa existir uma etiologia adicional à hipótese de lesão traumática em decorrência da cânula. Isso explicaria o surgimento tardio da cistite hemorrágica no animal do GII, visto que ele não se encaixa no padrão observado por Meyer et al. (2003) de surgimento agudo em 24-48 horas, como os demais animais. Até o presente momento, entretanto, estudos que correlacionem todas essas variáveis não parecem estar presentes na literatura, sendo possível somente especular-se.

A interpretação dos resultados das análises histopatológicas da ME permitiu observar a ausência de diferenças estatísticas entre os diferentes grupos experimentais. Assim, ficou demonstrado que a administração SA do meloxicam não foi responsável por elevar o número de lesões ou seu grau de severidade, quando comparada à administração de solução salina ou somente à manutenção da cânula SA Esses achados unem-se a relatos semelhantes (SVENSSON et al. 1993, GUEVARA-LÓPEZ et al., 2006; CALLEGARI et al., 2008) ou contrários (AMIOT et al., 1986) abordando o

emprego de outros AINEs, mas eram até então inexistentes no que se refere ao meloxicam.

Diversos trabalhos têm mostrado que a manutenção de uma cânula no espaço SA, com sua inserção através da membrana atlantooccipital, avançando por toda a extensão da ME, é capaz de causar compressão espinhal (YAKSH & RUDY, 1976; LI et al, 1985; GORDH et al., 1986), inflamação moderada (LI et al., 1985; GORDH et al., 1986; YAKSH & RUDY, 1976) com migração espinhal de células inflamatórias mononucleares (ALMEIDA et al., 2000), ativação microglial e astrogliose no tecido comprimido (JONES & TUSZYNSKI, 2001), bem como desmielinização (YAKSH & RUDY, 1976) e vacuolização neuronal (LI et al., 1985). A presença de um tecido meningeal cicatricial envolvendo a cânula foi também constatada por Jasmin & Ohara (2001).

Nesse estudo, conforme demonstrado nos resultados, a presença de lesões severas na análise microscópica da ME esteve restrita à área adjacente à cânula SA, exceto por um animal – pertencente ao GIII – que apresentou lesões severas difusas em toda a área medular. Nos demais ratos, as alterações foram associadas à compressão tecidual resultante da presença da cânula, confirmando os referidos trabalhos. Estes resultados vêm confirmar a dissociação entre as alterações histopatológicas e os efeitos do meloxicam SA sobre a ME, visto que alterações de maior severidade ocorreram em todos os grupos experimentais, sem diferença estatística entre eles. Adicionalmente, ficou demonstrado neste estudo que a presença destas alterações severas esteve significativamente associada à região cervical da ME, e não à região lombossacra, onde foram teoricamente depositadas as substâncias, sugerindo ser também resultado da inserção da cânula. Segundo Sakura et al. (1996), as alterações histológicas podem ser minimizadas pelo uso de cânulas menores ou compostas de outros materiais.

No que se refere à comparação entre o grau de severidade das lesões e a data da eutanásia dos animais, nenhuma diferença pôde ser constatada, demonstrando a ausência de evolução ou regressão dos danos neurológicos com o passar do tempo. Esses dados se adicionam à ausência de alterações clínicas neurológicas durante todo o período de avaliação dos animais, embora sinais clínicos de dano neuronal possam estar presentes mesmo na ausência de alterações histológicas (SVENSSON et al., 1992). A ausência de disfunções motoras, neurológicas e comportamentais também foi constatada por Takeda et al. (2005) após o uso do meloxicam SA em infusão contínua.

No presente experimento, a opção pelo uso de uma abordagem multifatorial, envolvendo análises estruturais, funcionais e comportamentais, permitiu demonstrar com clareza a ausência de efeitos deletérios do meloxicam sobre o modelo experimental empregado. Contudo, o potencial neurotóxico de uma substância é definido pela sua capacidade de afetar adversamente qualquer um dos componentes estruturais ou funcionais do sistema nervoso, a nível molecular ou celular, por exemplo (U.S. CONGRESS, 1990).

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que a administração subaracnóide do meloxicam na dose de 30μg.animal^{-1} não foi capaz de suprimir a hipernocicepção mecânica em um modelo de dor inflamatória induzida pela administração intraplantar de carragenina em ratos. Os dados resultantes das observações clínicas e das respostas nociceptivas sugerem que outras doses sejam pesquisadas antes que o efeito do fármaco seja descartado.

A administração do meloxicam SA na dose referida não produziu alterações clínicas, neurológicas ou comportamentais nos animais experimentais durante todo o período de avaliação. Adicionalmente, não houve alterações significativas no peso corporal dos animais submetidos à sua administração que diferissem dos demais grupos experimentais.

A análise histológica da ME demonstrou a ocorrência de lesões decorrentes da presença da cânula SA, sem associação, contudo, com a administração do meloxicam. A ocorrência, severidade e localização das lesões histológicas foram estatisticamente semelhantes em todos os grupos experimentais, entretanto a presença de lesões severas foi estatisticamente superior na região cervical da ME.

8 REFERÊNCIAS

AKERMAN, S.B.A. A methodological study of spinal (subarachnoid) anesthesia in the rat and the mouse. **British Journal of Anesthesia**, v.57, n.3, p.329-332, 1985.

ALMEIDA, A.P. et al. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.214, n.1, p.74-79, 1980.

ALMEIDA, F.R.C.et al. Chronic intrathecal cannulation enhances nociceptive responses in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.8, p.949-956, 2000.

AMIOT, J.F. et al. Spinal cord toxicity of lysine acetylsalicylate and ketamine hydrochloride administered intrathecally in the rat. **Annales Françaises d'Anesthèsie et de Rèanimation**, v.5, n.4, p.462, 1986.

ASATO, F. et al. Distibution of intrathecal catheter positions in rat. **Acta Anesthesiologica Scandinava**, v.45, n.5, p.608-611, 2001.

BASBAUM, A.I.; JESSEL, T.M. The perception of pain. In: KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. **Principles of neural science** 1.ed. New York: McGraw Hil, pp.472 – 791, 2000.

BEICHE, F. et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. **FEBS Letters**, v.390, n.2, p.165-169, 1996.

BIANCHI, M.; PANERAI, A.E. The dose-related effects of paracetamol on hyperalgesia and nociception in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v.117, n.1, p.130-132, 1996.

BISHOP, B. Pain: its physiology and rationale for management. Part I: neuroanatomical substrate of pain. **Physical Theraphy**, v.60, n.1, p.13-20, 1980.

BREDER, C.D. et al. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v.355, n.2, p.296-315, 1995.

BUSCH, U. et al. Pharmacokinetics of meloxicam in animals and the relevance to humans. **Drug Metabolism and Disposition**, v.26, n.6, p.576-584, 1998.

BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology and Therapeutics**, v.107, n.2, p.139-154, 2005.

BUSTAMANTE, D. et al. Effects of intrathecal or intracerebroventricular administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on a C-fiber reflex in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.281, n.3, p.1381-1391, 1997.

CALHOUN, W. et al. Effect of selected antiinflamatory agents and other drugs on zymosan, arachidonic acid, PAF, and carrageenan induced paw edema in mouse. **Agents and Actions**, v.21, n.3-4, 306-309, 1987.

CALLEGARI, D.C. et al. Neurotoxicidade aguda do cetoprofeno em medula espinhal de ratos. **Einstein**, v.6, n.1, p.82-85, 2008.

CAMPOS, R.O.P. et al. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B2 receptor antagonist. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.360, n.3, p.278-286, 1999.

CANDUZ, B. et al. Epidural lornoxicam administration – innocent. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.14, n.10, p.968-974, 2007.

CARVALHO, W.A. et al. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.54, n.3, pp.448-464, 2004.

CHANDRASEKHARAN, N.V. et al. Cox-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.21, p.13926-13931, 2002.

CHAVES, I.M.M.; GUSMAN, P.B. Anestesia subaracnóidea. In: MANICA, J. **Anestesiologia - princípios e técnicas**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.672-695.

CHOI, S.S. et al. The neurological safety of epidural gabapentin in rats: a light microscopy examination. **Anesthesia & Analgesia**, v.101, n.5, p.1422-1426, 2005.

COHEN, R.S.; PFAFF, D.W. Citology and organization of cell types: light and electron microscopy. In: CONN, P.M. **Neuroscience in Medicine**. 3ed. Totowa: Humana Press, 2008. p.1-23.

CONCEIÇÃO, M.J. Analgesia preemptiva. In: MANICA, J.M. **Anestesiologia - princípios e técnicas**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p.1258-1262.

COSTA, K.A. **Alodínia mecânica e edema de pata induzidos por um ativador da proteína quinase C, PDD: caracterização e comparação com as respostas induzidas pela carragenina**. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

COSTA, M.L.C. et al. Cateter de silicone no espaço peridural: modelo experimental no rato. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.41, n.2, p.105-109, 1991.

COSTIGAN, M.; WOOLF, C.J. Pain: molecular mechanisms. **The Journal of Pain**, v.1, n.3, sup.1, p.35-44, 2000.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, S.C.R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, v.42, n.3, p.392-402, 1971.

DeLEO, COLBURN, R.W.; RICKMAN, A.J.; YEAGER, M.P. Intrathecal catheterization alone induces neuroimmune activation in the rat. **European Journal of Pain**, v.1, n.2, p.115-122, 1997.

DELLMAN, H.D.; McCLURE, R.C. Sistema nervoso central. In: GETTY, R. **Sisson/Grossman – Anatomia dos animais domésticos**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1986. p.186-206.

DIRIG, D.M. et al. Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.285, n.3, p.1031-1038, 1998.

DI ROSA, M; SORRENTINO, L. Some pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v.38, n.1, p.214-220, 1970.

DOBOS, I. et al. The significance of intrathecal catheter location in rats. **Anestesia & Analgesia**, v.96, n.2, p.487-492, 2003.

DUBNER, R.; BENNETT, G J. Spinal mechanisms of nociception. **Annual Review of Neuroscience**, v.6, pp.381-418, 1983.

EISENACH, J.C. et al. Effects of intrathecal ketorolac on human experimental pain. **Anesthesiology**, v.112, n.5, p.1216-1224, 2010.

ENGELHARDT, G. Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of cox-2. **British Journal of Rheumatology**, v.35, supp.1, p.4-12, 1996.

ENGELHARDT, G. et al. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new-steroidal anti-inflammatory agent with favorable gastrointestinal tolerance. **Inflammation Research**, v.44, n.10, 423-433, 1995.

FANTONI, D.T.; OTSUKI, D.A. Anestesia em animais de pesquisa. In: MANICA, J. **Anestesiologia – princípios e técnicas**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p.137-153.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature: New Biology**, v.240, n.102, p.200-203, 1972.

FIELDS, H.L. et al. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: MCMAHON, S.; KOLTZENBURG, M. **Textbook of pain**. 5ed. Burlington: Elsevier Health Sciences, 2005, p.125-142.

FITZGERALD, G.A; PATRONO, C.P. The coxibs, selective inhibitors of cycloxygenase-2. **The New England Journal of Medicine**, v.345, p.433-442, 2001.

FRANCISCHI, J.N. et al. Selective inhibitors of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) induce hypoalgesia in a rat paw model of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.137, n.6, p.837-844, 2002.

FUTAKI, N. et al. Selective inhibition of NS-398 on prostanoid production in inflamed tissue in rat carrageenan-air-pouch inflammation. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.45, n.8, p.753-755, 1993.

GALER, B. et al. Pain. In: DALE, D.C.; FEDERMAN, D.D. **WebMD scientific american medicine**. New York: WebMD Corporation, 2002, p.13.

GARCIA LEME, J. et al. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. **British Journal of Pharmacology**, v.48, n.1, p.88-96, 1973.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tecido nervoso. In: ____**Tratado de histologia**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. p.149.

GAERTNER. D.J. et al. Anesthesia and analgesia for laboratory rodents. In: FISH, R.E. et al. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**. 2ed. London: Academic Press, 2008, p.239-297.

GEBHART, G.F. Visceral polymodal receptors. **Progress in Brain Research**, v.113, p.101–112, 1996.

GILRON, I. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors in postoperative pain management - current evidence and future directions. **Anesthesiology**, v.99, n.5, p.1198-1208, 2003

GORDH, T. et al. Evaluation of the toxicity of subarachnoid clonidine, guanfacine, a substance P-antagonist on rat spinal cord and nerve roots: light and electron microscopic observations after chronic intrathecal administration. **Anesthesia & Analgesia**, v.65, n.12, p.1303-1311, 1986.

GOSHGARIAN, H.G. Anatomy and function of the spinal cord. In: LIN, W.V. **Spinal cord medicine – principles and practice**, New York: Demos Medical Publishing, 2003, p.15-34.

GOTTSCHALK, A.; SMITH, D.S. New concepts in acute pain therapy: preemptive analgesia. **American Family Physician**, v.63, n.10, p.1979-1984, 2001.

GOZZANI, J.L. Analgesia pós-operatória. In: MANICA, J.M. **Anestesiologia - princípios e técnicas**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, p.1263-1270.

GREEN, A.Y. et al. Factors influencing the inhibitory action of anti-inflammatory drugs on carrageenin induced oedema. **British Journal of Pharmacology**, v.41, n.1, p.132-139, 1971.

GUEVARA-LÓPEZ, U. et al. Chronic subarachnoid administration of 1-(4chlorobenzoyl)-5methoxy-2methyl-1h-indole-3 acetic acid (indomethacin): na

evaluation of its neurotoxic effects in an animal model. **Anesthesia & Analgesia**, v.103, n.1, p.99-102, 2006.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Controle local do fluxo sanguíneo pelos tecidos. In:____ **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. p.166-173.

HEBEL, R.; STROMBERG, M.W. **Anatomy and embryology of the laboratory rat**. München: Bio Med Verlag Wörthsee, 1986. 270p.

HEISE, C.; KAYALIOGLU, G. Cytoarchitecture of the spinal cord. In: WATSON, C. et al. **The spinal cord – a Christopher and Dana Reeve Foundation text and atlas**. Burlington: Elsevier Academic Press, 2008. p.64-93.

HELLEBREKERS, L.J. Fisiopatologia da dor em animais. In:____**Dor em animais**. São Paulo: Manole, 2002. p.69-79.

HERRERO, J.F. et al. Central and peripheral actions of the NSAID ketoprofen on spinal cord nociceptive reflexes. **Neuropharmacology**, v.36, n.10, p.1425-1431, 1997.

HIGGS, G.A. et al. The effects of non-steroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenin-induced inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v.66, n.1, p.81-86, 1980.

HILÁRIO, M.O.E. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v.82, n.5 (suppl), p.S206-S212, 2006.

HOCKING, G.; WILDSMITH, J.A.W. Intrathecal drug spread. **British Journal of Anaesthesia**, v.93, n.4, p.568-578, 2004.

HODGSON, P.S. et al. The neurotoxicity of drugs given intrathecally (spinal). **Anesthesia & Analgesia**, v.88, n.4, p.797-809, 1999.

HUNT, S.P.; MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Nature Reviews - Neuroscience**, v.2, n.2, pp.83-91, 2001.

JASMIN, L. et al. Activation of CNS circuits producing a neurogenic cystitis: evidence for centrally induced peripheral inflammation. **The Journal of Neuroscience**, v.18, n.23, p.10016-10029, 1998.

JASMIN, L.; OHARA, P.T. Long-term intrathecal catheterization in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.110, n.1-2, p.81-89, 2001.

JENSEN, T.S.; YAKSH, T.L. Brainstem excitatory amino acid receptors in nociception: microinjection mapping and pharmacological characterization of glutamate-sensitive sites in the brainstem associated with algogenic behavior. **Neuroscience**, v.46, n.3, p.535-547, 1992.

JOHANSON, C.E. et al. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. **Cerebrospinal Fluid Research**, v.5, n.10, p.1-32, 2008.

JONES, L.L.; TUSZYNSKI, M.H. Chronic intrathecal infusion after spinal cord injury cause scarring and compression. **Microscopy Research and Technique**, v.54, n.5, p.317-324, 2001.

JONES, S.L. Anatomy of pain. In Sinatra, R.S.; Hord, A.H.; Ginsberg, B.; PREBLE, L. **Acute pain: mechanisms & management**. St. Louis: Mosby–Year Book, 1992.

JULIUS, D; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, n.6852, pp.203-210, 2001.

KASUKURTHI, R. et al. Transcardial perfusion versus immersion fixation for assessment of peripheral nerve regeneration. **Journal of Neuroscience Methods**, v.184, n.2, p.303-309, 2009.

KAYSER, V.; GUILBAUD, G. Local and remote modifications of nociceptive sensitivity during carrageenin-induced inflammation in the rat. **Pain**, v.28, n.1, p.99-107, 1987.

KELLY, D.J. et al. Preemptive analgesia I: physiological pathways and pharmacological modalities. **Regional Anesthesia and Pain**. v.48, n.10, p.1000-1010, 2001.

KIMURA, S.; KONTANI, H. Demonstration of antiallodynic effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor meloxicam on established diabetic neuropathic pain in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.110, n.2, pp.213-217, 2009.

KIRIHARA, Y. et al. Comparative neurotoxicity of intrathecal and epidural lidocaine in rats. **Anesthesiology**, v.99, n.4, pp.961-968, 2003.

KLAUMANN, P.R. et al. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.31, p.1-12, 2008.

KORKMAZ, H.A. et al. Antinociceptive and neurotoxicologic screening of chronic intrathecal administration of ketorolac tromethamine in the rat. **Anesthesia & Analgesia**, v.98, n.1, p.148-152, 2004.

KRAYCHETE, D.C. et al. Dor neuropática – aspectos neuroquímicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.58, n.5, p.492-505, 2008.

KULKARNI, S.K. et al. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v.22, n.5, p.291-298, 2000.

LEAL, L.B. et al. Desenvolvimento de teste de dissolução para o meloxicam utilizando o planejamento fatorial: estudo comparativo de produtos industrializados x produtos magistrais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n.2, p.160-163, 2008.

LE BARS, D. et al. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v.53, n.4, p.597-652, 2001.

LEBEDEV, S.V. et al. Spatial characteristics of cisterna magna in rats and novel technique for puncture with a stereotactic manipulator. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.137, n.6, p.635-638, 2004.

LEONI, M.E.G.; RUZ, A.E. Management of urinary tract infection in patients with spinal cord injuries. **Clinical Microbiology and Infection**, v.9, n.8, p.780-785, 2003.

LEVINE, J.D.; REICHLING, D.B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. 4ed. Edinburgh:Churchill Livingstone, 1999, p.59-84.

LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Life Sciences**, v.8, n.11, p. 601-606, 1969.

LI, D. et al. Neurological toxicity of the subarachnoid infusion of bupivacaine, lignocaine or 2-chloroprocaine in the rat. **British Journal of Anaesthesia**, v.57, n.4, p.424-429, 1985.

LIM, Y.J. et al. The neurotoxicity of epidural hyaluronic acid in rabbits: a light and electron microscopy examination. **Anesthesia & Analgesia**, n.97, v.6, p.1716-1720, 2003.

LOPEZ-GARCIA, J.A.; LAIRD, J.M.A. Central antinociceptive effects of meloxicam on rat spinal cord in vitro. **Neuroreport**, v.9, n.4, p.647-651, 1998.

LUMB, W.V.; JONES, E.W. Anesthesia and immobilization of specific species. In: THURMON, J.C. et al. **Lumb e Jones' veterinary anesthesia**. 3ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1996, p.686-735.

MACPHAIL, R.C. Animal models: what has worked and what is needed. In: RUSSELL, R.W. et al. **Behavioral Measures of Neurotoxicity**. Washington: The National Academies Press, 1990, p.185-189.

MALINOVSKY, J.M. et al. Is ketamine or its preservative responsible for neurotoxicity in the rabbit? **Anesthesiology**, v.78, n.1, p.109-115, 1993.

MALKMUS, S.A.; YAKSH, T.L. Intrathecal catheterization and drug delivery in the rat. In: LUO, D. **Pain research – methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2004, p.109-122.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.263, n.1, pp.136-146, 1992a.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. **Science**, v.257, n.5074, p.1276-1279, 1992b.

MARTIN, F. et al. Constitutive cyclooxygenase-2 is involved in central nociceptive processes in humans. **Anesthesiology**, v.106, n.5, p.1013-1018, 2007.

MASSUE, T. et al. Spinal antinociceptive effect of epidural nonsteroidal antiinflammatory drugs on nitric oxide induced hyperalgesia in rats. **Anesthesiology**, v.91, n.1, p.198-206, 1999.

MCCORMACK, K. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and spinal nociceptive processing. **Pain**, v.59, n.1, p.9-43, 1994.

MELZACK, R. et al. Central neuroplasticity and pathological pain. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.933, p.157-174, 2001.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v.150, p.971-979, 1965.

MENEZES, M.S. Anatomia e fisiologia da dor. In: MANICA, J.M. **Anestesiologia - princípios e técnicas**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, pp.1251-1257, 2004.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthesist**, v.46, n.2, p.142-153, 1997.

MEYER, F. et al. Alterações vesicais na lesão medular experimental de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.3, p.203-208, 2003.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.66, p.1-164, 1999.

MILLER, D.C. Use of perfusion fixation for improved neuropathologic examination. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.121, n.11, p.949, 1998.

MIRANDA, H.F.; PINARDI, G. Lack of effect of naltrexone on the spinal synergism between morphine and non steroidal anti-inflammatory drugs. **Pharmacological Reports**, v.61, n2., p.266-274, 2009.

MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **British Journal of Pharmacology**, v.128, n.6, p.1121-1132, 1999.

MOLANDER, C. et al.The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the rat. I. The lower thoracic and lumbosacral cord. **The Journal of Comparative Neurology**, v.230, n.1, p.133-141, 1984.

MUGURUMA, T. et al. Epidural lidocaine induces dose-dependent neurologic injury in rats. **Anesthetic Pharmacology**, v.103, n.4, p.876-881, 2006.

NANTEL, F. et al. Distribution and regulation of cycloocygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.128, n.4, p.853-859, 1999.

NAKAYAMA, Y. et al. Role of prostaglandin receptor EP_1 in the spinal dorsal horn in carrageenan-induced inflammatory pain. **Anesthesiology**, v.97, n.5, p.1254-1262, 2002.

NEWTON, B.W. Anatomy of the spinal cord and brain. In: CONN, P.M. **Neuroscience in medicine**. 3ed. Totowa: Humana Press, 2008. p.25-51.

NIROGI, R. et al. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. **Journal of Neuroscience Methods**, v.178, n.1, p.116-119, 2009.

NISHIYAMA, T. A rat model of chronic lumbar epidural catheterisation. Canadian Journal of Anaesthesia, v.45, n.9, p.907-912, 1998.

OSBORNE, M.G..; CODERRE, T.J. Effects of intrathecal administration of nitric oxide synthase inhibitors on carrageenan-induced thermal hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.126, n.8, p.1840-1846, 1999.

OSSIPOV, M.H. et al. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.11, p.3779-3787, 2010.

ÖZTEMÜR, Z. et al. Evaluation of urinary bladder function after acute spinal cord injury: an experimental study. **Joint Diseases and Related Surgery**, v.21, n.2, p.110-115, 2010.

PANKSEPP, J. Brief social isolation, pain responsiveness, and morphine analgesia in young rats. **Psycopharmacology**, v.72, n.1, p.111-112, 1980.

PARRIS, W.C.V. et al. Intrathecal ketorolac tromethamine produces analgesia after chronic constriction injury of sciatic nerve in rat. **Canadian Journal of Anesthesia**, v.43, n.8, p.867-870, 1996.

PEGG, C.C. et al. Technique for collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.187, n.1, p.8-12, 2010.

PINARDI, G. et al. Analgesic synergism between intrathecal morphine and cyclooxygenase-2 inhibitors in mice. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**. v.82, n.1, p.120-124, 2005.

PINARDI, G. et al. Atropine reverses the antinociception of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the tail-flick test of mice. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v.74, n.3, pp.603-608, 2003.

PINHEIRO, R.M.; CALIXTO, J.B. Effect of the selective COX-2 inhibitors, celecoxib and rofecoxib in rat acute models of inflammation. **Inflammation Research**, v.51, n.12, p.603-610, 2002.

PLEUVRY B.J.; LAURETTI, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacology and Therapeutics**, v.71, n.3, pp.313-324, 1996.

PLONER, M. et al. Pain processing is faster than tactile processing in the human brain. **The Journal of Neuroscience**, v.26, n.42, p.1079-1082, 2006.

POON, Y.Y. et al. An improved procedure for catheterization of the thoracic spinal subarachnoid space in the rat. **Anesthesia & Analgesia**, v.101, n.1, p.155-160, 2005.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v.142, n.2, p.331-338, 2004.

PRADO, W.A. Antinociceptive potency of intrathecal morphine in the rat tail flick test: a comparative study using acute lumbar catheter in rats with or without a chronic atlanto-occipital catheter. **Journal of Neuroscience Methods**, v.129, n.1, p.33-39, 2003.

PURVES, D. et al. **Neuroscience**. 2ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2001, 681p.

RAJA, S.N. et al. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingston, 1999, p. 11–57.

RATHMELL, J.P. et al.The role of intrathecal drugs in the treatment of acute pain. **Anesthesia & Analgesia**, v.101, sup.5, p.S30-43, 2005.

READY, L.B. et al. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. **Anesthesiology**, v.63, n.4, pp.364-370, 1985.

RENDEAU, D. et al. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparision with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.296, n.2, p.558-566, 2001.

REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: a update. **Pain**, v.100, n.1-2, p.1-6, 2002.

REN, K. et al. The intrathecal administration of excitatory amino-acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.219, n.2, p.235-243, 1992.

RENELLA, R.R.; HUSSEIN, S. Microsurgical approach to the cerebellomedullar region in rat. **Laboratory Animals**, v.20, n.3, p.210-212, 1986.

REXED, B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. **The Journal of Comparative Neurology**, v.100, n.2, p.297-379, 1954.

ROVATI, L.C. et al. Chronic intrathecal cannulation affects hypothalamic beta-endorphin and met-enkephalin concentrantions. **Journal of Pharmacological Methods**, v.19, n.1, p.85-88, 1988.

SAKURA, S. et al. Intrathecal catheterization in the rat. Improved technique for morphologic analysis of drug-induced injury. **Anesthesiology**, v.85, n.5, p.1184-1189, 1996.

SAKURA, S. et al. The comparative neurotoxicity of intrathecal lidocaine and bupivacaine in rats. **Anesthesia & Analgesia**, v.101, n.2, p.541-547, 2005.

SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.118, n.4, p.829-838, 1996.

SAMAD, T.A. et al. Interleukin-1 beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v.410, n.6827, p.471-475, 2001.

SANTOS, A.R.S. et al. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, v.47, n.7, p.302-307, 1998.

SCHOENEN, J.; FAULL, R.L.M. Spinal cord: cyto- and chemoarchitecture. In: PAXINOS, G.; MAI, J.K. **The human nervous system**. 2ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004, p.190-232.

SERPELL, M.G. et al. Intrathecal catheterization alone reduces autonomy after sciatic cryoneurolysis in the rat. **Life Sciences**, v.53, p.1887-1892, 1993.

SHI, L. et al. Intrathecal catheterization and solvents interfere with cortical somatosensory evoked potentials used in assessing nociception in awake rats. **Anesthesia & Analgesia**, v.99, n.1, p.159-165, 2004.

SIDMAN, R.L. et al. **Atlas of the mouse brain and spinal cord**. Cambridge: Harvard University Press, 1971. 290p.

SIEGAL, T. et al. Early and delayed neurotoxicity of mitoxantrone and doxorubicin following subarachnoid injection. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 6, n.2, p.135-140, 2006.

SLIKKER Jr, W.; BOWYER, J.F. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.206, n.2, p.255-260, 2005.

SMITH, C.J. et al. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.22, p.13313-13318, 1998.

STØRKSON, R.V. et al. Lumbar catheterization of the spinal subarachnoid space in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.65, n.2, p.167-172, 1996.

SUGISHITA, E. et al. Antiinflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **Journal of Pharmacobio-dynamics**, v.4, n.8, p.565-575, 1981.

SVENSSON, B.A. et al. Repeated intrathecal injections of dezocine produce antinociception without evidence for neurotoxicity in the rat: a study of morphometric evaluation of spinal cord histology. **Anesthesia & Analgesia**, v.75, n.3, p.392-399, 1992.

SVENSSON, B.A. et al. Intrathecal injection of lysine acetylsalicylic acid in the rat: a neurotoxicological study. **Acta Anaesthesiologica Scandinava**, v.37, n.8, p.799-805, 1993.

SVENSSON, B.A. et al. Chronic subarachnoid midazolam (Dormicum) in the rat: morphologic evidence of spinal cord neurotoxicity. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v.20, n.5, p.426-434, 1995.

TAKEDA, K. et al. Role for cyclooxygenase 2 in the development and maintenance of neurophatic pain and spinal glial activation. **Anesthesiology**, v.103, n.4, p.837-844, 2005.

TASAKA, A.C. Antiinflamatórios não-esteroidais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999, p.212-226.

TEIXEIRA, M.J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial**, v.1, n.4, p.329-334, 2001.

TORIYABE, M. et al. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. **Anesthesiology**, v.101, n.4, p.983-990, 2004.

TRANQUILLI, W.J. Fisiologia da dor aguda. In: GREENE, S.A. **Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.399-402.

TSANG, B.K. et al. Decreased paralysis and better motor coordination with microspinal versus PE10 intrathecal catheters in pain study rats. **Anesthesia & Analgesia**, v.84, n3., p.591-594, 1997.

TURNER, P.V. et al. Pharmacokinetics of meloxicam in rabbits after single and repeat oral dosing. **Comparative Medicine**, v.56, n.1, p.63-67, 2006.

UMMENHOFER, W.C. et al. Comparative spinal distribution and clearance kinetics of intrathecally administered morphine, fentanyl, alfentanil, and sufentanil. **Anesthesiology**, v.92, n.3, p.739-753, 2000.

US CONGRESS – OFFICE OF TECHNOLOGY ASSESSMENT, **Neurotoxicity: identifying and controlling poisons of the nervous system. OTA-BA-436.** Washington: U.S. Government Printing Office, 1990. p.361.

VANE, J.R. et al. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.38, p.97-120, 1998.

VANEGAS, H; SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cycloxygenases in the spinal cord. **Progress in Neurobiology**, v.64, p.327-363, 2001.

VASCONCELOS FILHO, P.O. et al. Comparação das alterações histológicas da medula espinal e neurológicas de cobaias após anestesia subaracnóidea com grandes volumes de bupivacaína racêmica, de mistura com excesso enantiomérico de 50% de

bupivacaína (S75-R25) e de levobupivacaína. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.58, n.3, pp.234-245, 2008.

VINEGAR, R. et al. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Federation Proceedings**, v.46, n.1, p.118-126, 1987.

VIVANCOS, G.G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.3, p.401-407, 2004.

VRANKEN, J.H. et al. Severe toxic damage to the rabbit spinal cord after intrathecal administration of preservative-free S(+)-ketamine. **Anesthesiology**, v.105, n.1, pp.813-818, 2006.

WAISBROD, H. et al. Chronic pain in paraplegics. **Neurosurgery**, v.15, n.6, p.933-934, 1984.

WANG, B.C.. et al. Analgesia following subarachnoid sodium ibuprofen in rats. **Anesthesiology**, v.79, n.3A, pp.856, 1992.

WANG, B.C. et al. The antinociceptive effect of S-(+)-ibuprofen in rabbits: epidural versus intravenous administration. **Anesthesia & Analgesia**, v.80, n.1, p.92-96, 1995.

WANG, B.B. et al. Lumbar subarachnoid catheterization in rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v.38, n.3, p.685-688, 1991.

WHITE, P.F. The role of non-opioid analgesic techniques in the management of pain after ambulatory surgery. **Anesthesia & Analgesia**, v.94, n.3, pp.577-585, 2002.

WILLIAMS, T.J.; MORLEY, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. **Nature**, v.246, n.5430, p.215-217, 1973.

WILLINGALE, H.L. et al. Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. **British Journal of Pharmacology**, v.122, n.8, p.1593-1604, 1997.

WILNE, S.; WALKER, D. Spine and spinal cord tumours in children: a diagnostic and therapeutic challenge to healthcare systems. **Archives of Disease in Childhood – Education and Practice Edition**, v.95, n.2, p.47-54, 2010.

WINTER, C.A. et al. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflamatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.111, p.544-547, 1962.

WIXSON, S.K. et al. The effects of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam on arterial blood pH, blood gases, mean arterial blood pressure and heart rate in adult male rats. **Laboratory Animal Science**, v.37, n.6, p.736-742, 1987.

WONG, E.H.; KEMP, J.A. Sites for antagonism on the N-methyl-Daspartate receptor channel complex. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.31, p.401–25, 1991.

WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specif pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine**, v.140, n.6, p.441-451, 2004.

WOOLF, C.J.; CHONG, M.S. Preemptive analgesia – treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. **Anesthesia & Analgesia**, v.77, n.2, p.362-379, 1993.

XIE, W.L. et al. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prosglandin synthase is regulated by mRNA splicing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.88, n.7, p.2692-2696, 1991.

XU, F.; LI, T.; ZHANG, B. An improved method for protecting and fixing the lumbar catheters placed in the spinal subarachnoid space of rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v.183, n.2, p.114-118, 2009.

YAKSH, T.L.; RUDY, T. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. **Physiology & Behavior**, v.17, n.6, p.1031-1036, 1976.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. Analysis of the effects of cyclo-oxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS398, a COX-selective inhibitor. **Brain Research**, v.739, n.1-2, p.104-110, 1996.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. Role of spinal cyclooxygenase (COX)-2 on thermal hyperalgesia evoked by carageenan injection in the rat. **Neuroreport**, v.8, n.9-10, p.2179-2182, 1997.

YAMASHITA, A. et al. A comparision of the neurotoxic effects on the spinal cord of tetracaine, lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine administered intrathecally in rabbits. **Anesthesia & Analgesia**, v.97, n.2, pp.512-519, 2003.

YOO, K.H.; LEE, S.J. Experimental animal models of neurogenic bladder dysfunction. **International Neurology Journal**, v.14, n.1, p.1-6, 2010.

YOON, M.H.; YAKSH, T.L. Evaluation of interaction between gabapentin and ibuprofen on the formalin test in rats. **Anesthesiology**, v.91, n.4, p.1006-1013, 1999.

ZHANG, Y. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hyperalgesia and prostaglandin E2 production. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.283, n.3, p.1069-1075, 1997.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109-110, 1983.

ANEXO 1 – Carta de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais

HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 100147 **Versão do Projeto:** 26/09/2010

Pesquisadores:
EMERSON ANTONIO CONTESINI
LANUCHA FIDELIS DA LUZ MOURA
KARINA MAGANO GUIMARÃES
NILSON OLESKOVICZ
VÍVIAM NUNES PIGNONE
JAMILE BORGES MENDES
ANELISE BONILLA TRINDADE
LUISE MEURER

Título: Avaliação dos efeitos antinociceptivos mecânicos e neurotóxicos da administração aguda do meloxicam por via subaracnóidea em ratos Wistar

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente a CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 28 de setembro de 2010.

Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

APÊNDICE A – Ficha de avaliação neurológica

FICHA DE AVALIAÇÃO NEUROLÓGICA

ANIMAL N°___

DIA 1 - ____/____/2010 **PESO:**_____

Habilidade de andar	Flexão da pata posterior	Sensação cutânea
normal ( )	normal ( )	normal ( )
diminuída ( )	diminuída ( )	diminuída ( )
ausente ( )	ausente ( )	ausente ( )

outras alterações_____

DIA 2 - ____/____/2010 **PESO:**_____

Habilidade de andar	Flexão da pata posterior	Sensação cutânea
normal ( )	normal ( )	normal ( )
diminuída ( )	diminuída ( )	diminuída ( )
ausente ( )	ausente ( )	ausente ( )

outras alterações_____

DIA 3 - ____/____/2010 **PESO:**_____

Habilidade de andar	Flexão da pata posterior	Sensação cutânea
normal ( )	normal ( )	normal ( )
diminuída ( )	diminuída ( )	diminuída ( )
ausente ( )	ausente ( )	ausente ( )

outras alterações_____

DIA 4 - ____/____/2010 **PESO:**_____

Habilidade de andar	Flexão da pata posterior	Sensação cutânea
normal ( )	normal ( )	normal ( )
diminuída ( )	diminuída ( )	diminuída ( )
ausente ( )	ausente ( )	ausente ( )

outras alterações_____

DIA 5 - ____/____/2010 **PESO**_____

Habilidade de andar	Flexão da pata posterior	Sensação cutânea
normal ( )	normal ( )	normal ( )
diminuída ( )	diminuída ( )	diminuída ( )
ausente ( )	ausente ( )	ausente ( )

outras alterações_____

DIA 6 - ____/____/2010 **PESO:**_____

Habilidade de andar	Flexão da pata posterior	Sensação cutânea
normal ( )	normal ( )	normal ( )
diminuída ( )	diminuída ( )	diminuída ( )
ausente ( )	ausente ( )	ausente ( )

outras alterações_____

DIA 7 - ____/____/2010 **PESO:**_____

Habilidade de andar	Flexão da pata posterior	Sensação cutânea
normal ( )	normal ( )	normal ( )
diminuída ( )	diminuída ( )	diminuída ( )
ausente ( )	ausente ( )	ausente ( )

outras alterações_____

APÊNDICE B – Valores do Δ do limiar de retirada nos momentos de avaliação

RATO	GRUPO	VALOR BASAL	30 MIN	60MIN	90MIN	120MIN	150MIN	180MIN	210MIN	240MIN
ANIMAL 15	GRUPO 1	73,23	-19,33	24	39,1	17,5	28,27	36,77	43	20,37
ANIMAL 18	GRUPO 1	81,23	14,93	34,23	35,07	27,17	52,57	46,77	42,1	59,5
ANIMAL 22	GRUPO 1	69,56	12	27,83	21,76	34,6	40,23	33,16	47,33	60,1
ANIMAL 29	GRUPO 1	72,66	29,53	25,83	17,33	38,43	27,96	27,03	48,3	51,03
ANIMAL 39	GRUPO 1	35,13	-8,93	-20,17	-0,33	-12,67	2,77	17,73	14,73	22,5
ANIMAL 41	GRUPO 1	60,3	4,64	16,17	9,5	8,17	16,5	10,6	15,44	20,1
ANIMAL 50	GRUPO 1	74,86	21,56	24,83	19,63	41,63	50,06	47,36	54,36	46,86
ANIMAL 54	GRUPO 1	73,96	16,56	7,16	11,1	20,83	18,23	14	27,23	33,96
ANIMAL 69	GRUPO 1	67,43	43,56	43,98	36	37,64	37,79	13,65	35	55,06
ANIMAL 20	GRUPO 2	92,66	51,93	49,1	41,2	53,86	40,36	74,2	76,93	77,83
ANIMAL 23	GRUPO 2	29,83	-21,47	-16,8	0	-5,57	0,77	-6,9	6,87	13,53
ANIMAL 24	GRUPO 2	47,23	-3,67	0,23	1,27	15,13	16,17	7	30,6	26,33
ANIMAL 31	GRUPO 2	95,33	54,67	45,1	52,67	60,53	68,6	57,53	72,53	69,2
ANIMAL 33	GRUPO 2	56,56	-5,84	-0,34	11,1	1	18,83	13,73	29,9	36,36
ANIMAL 47	GRUPO 2	59,46	22,43	18,1	16,23	0,73	1,03	33,1	27,33	47,53
ANIMAL 48	GRUPO 2	63,7	0,1	-18,03	-3,1	0,47	2,3	5,97	2,04	14,27
ANIMAL 52	GRUPO 2	76,5	-0,06	24,97	8,6	11,27	11,95	18,74	33,44	25,6
ANIMAL 56	GRUPO 2	82,73	31,37	32,17	27,67	29,83	55,17	68,87	59,93	63,6

APÊNDICE C – Peso corporal dos animais experimentais nos momentos de avaliação

RATO	GRUPO	PESO INICIAL	GANHO PESO 0-7D	GANHO PESO 0-14D	PESO 7 DIAS	PESO 14 DIAS
ANIMAL 15	GRUPO 1	381,07	-11,82%	*	336	*
ANIMAL 18	GRUPO 1	377,32	-6,01%	*	354,62	*
ANIMAL 22	GRUPO 1	389,33	-1,19%	3,31%	384,69	402,25
ANIMAL 29	GRUPO 1	318,57	*	*	*	*
ANIMAL 39	GRUPO 1	289,5	-3,01%	3,26%	289,49	308,24
ANIMAL 41	GRUPO 1	328,29	-12,22%	-7%	288,17	305,29
ANIMAL 50	GRUPO 1	349,82	-21,93%	*	273,09	*
ANIMAL 54	GRUPO 1	327,51	*	*	*	*
ANIMAL 69	GRUPO 1	327,87	*	*	*	*
ANIMAL 20	GRUPO 2	324,62	-9,68%	-3,81%	293,18	312,24
ANIMAL 23	GRUPO 2	352,57	-14,68%	-7,47%	300,8	326,2
ANIMAL 24	GRUPO 2	350,78	-6,21%	*	328,97	
ANIMAL 31	GRUPO 2	306,83	*	*	*	*
ANIMAL 33	GRUPO 2	364,76	-6,56%	-6,80%	340,81	339,95
ANIMAL 47	GRUPO 2	334,37	-7,21%	*	310,23	*
ANIMAL 48	GRUPO 2	342,39	*	*	*	*
ANIMAL 52	GRUPO 2	371,06	-9,42%	*	336,07	*
ANIMAL 56	GRUPO 2	315,87	*	*	*	*
ANIMAL 01	GRUPO 3	372,84	-3,11%	*	361,23	*
ANIMAL 02	GRUPO 3	381,78	-4,38%	*	374,54	*
ANIMAL 06	GRUPO 3	432,3	-6,12	-5,53%	405,83	408,38
ANIMAL 08	GRUPO 3	394,76	-3,11%	*	382,48	*
ANIMAL 09	GRUPO 3	397,12	-10,64%	-8,97%	354,83	361,49
ANIMAL 11	GRUPO 3	380,18	*	*	*	*
ANIMAL 12	GRUPO 3	364,64	*	*	*	*
ANIMAL 13	GRUPO 3	361,29	*	*	*	*
ANIMAL 42	GRUPO 3	357,24	-16,35%	-6,18%	298,83	335,15