

DAYANA ALERSA CONCEIÇÃO FERREIRA ERMITA

**RAQUIANESTESIA COM ROPIVACAÍNA, CETAMINA E
DEXMEDETOMIDINA – ESTUDO DA NEUROTOXICIDADE E AVALIAÇÃO
DE BLOQUEIO MOTOR E SENSORIAL EM COELHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

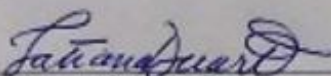
VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019


DAYANA ALERSA CONCEIÇÃO FERREIRA ERMITA

**RAQUIANESTESIA COM ROPIVACAÍNA, CETAMINA E
DEXMEDETOMIDINA – ESTUDO DA NEUROTOXICIDADE E
AVALIAÇÃO DE BLOQUEIO MOTOR E SENSORIAL EM COELHO**

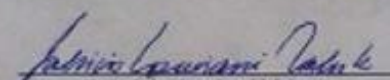
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

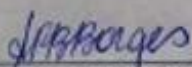
APROVADA: 28 de fevereiro de 2019.


Tatiana Schmitz Duarte


Vanessa Guedes Pereira


Lukiya Silva Campos Favarato


Fabrício Luciani Valente
(Coorientador)


Andréa Pacheco Batista Borges
(Orientadora)

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

E71r
2019

Ermita, Dayana Alerça Conceição Ferreira, 1988-
Raquianestesia com ropivacaína, cetamina e
dexmedetomidina - estudo da neurotoxicidade e avaliação de
bloqueio motor e sensorial em coelho / Dayana Alerça
Conceição Ferreira Ermita. – Viçosa, MG, 2019.
xiii, 79 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Coelhos. 2. Analgesia. 3. Anestesia. 4. Raquianestesia.
5. Neurotoxicologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.9322

Ao meu esposo, Pedro Ermita,

A ti não cabem palavras, e não necessitaria usá-las; são seus as vírgulas, os pontos, os parágrafos e todo o contexto, é seu da capa aos anexos e é seu o que há por trás de tudo isso.

À minha amada família,

Enquanto vocês existirem haverá pureza, riso atoa e abraço apertado; enquanto vocês respirarem haverá fé, esperança força e união; com vocês vou muito longe, se um de mim já tem garra, imagine vários.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pela saúde para trabalhar, pelas oportunidades que sempre me concede para minha evolução, e por ter cuidado de cada detalhe não me deixando desistir nos momentos difíceis.

Agradeço à minha **família**, meu bem mais precioso. Meu querido pai **Pedro Ferreira** e meus irmãos **Deijane, Arthur e Adailton**, que sempre me incentivaram incondicionalmente e que são meus maiores suportes. Se hoje eu tenho uma base suficiente para aguentar os trancos da vida, devo isso a vocês que ajudaram a construir o meu caráter da melhor forma.

Meu agradecimento profundo ao **Pedro Ermita**. Nos momentos difíceis, que não foram raros nestes últimos anos, esteve ao meu lado. Vencemos mais esta etapa da nossa caminhada.

Minha gratidão à Prof. Dra **Andréa Borges** pela orientação, confiança, e por todos os ensinamentos e suporte nesse período de crescimento profissional. Obrigada por ser uma orientadora presente, incentivadora e atenciosa. Você é um espelho para mim.

Por todo apoio profissional e pessoal, por tudo que pude aprender com o conhecimento e experiência compartilhados, pelo direcionamento nos momentos de dúvida e pelo ombro amigo que nunca faltou, minha profunda gratidão ao Prof. Dr. **Fabício Valente**.

Agradeço à Prof. Dra **Lukiya Favarato** pelo desvelo em assumir a co-orientação de um projeto complexo, em um momento decisivo, no qual o incontrolável tempo se mostrou nosso maior algoz.

Pelo conhecimento partilhado e pela atenção infalível em todos os momentos de necessidade, admiro e sou grata à Prof. Dra **Emily Carlo**.

Agradeço aos Professores Dr. **Rinaldo Viana** e Dr. **José Dantas** pelo incentivo para continuar a vida acadêmica fazendo o doutorado. Obrigada por abrirem as portas para o meu crescimento profissional.

Aos padrinhos e amigos **Fabírcia Girardi** e Dr. **Leandro Abreu**, agradeço o carinho, cuidado, atenção e apoio, profissional e pessoal, que me foram dispensados nesses últimos anos. Vocês foram fundamentais para essa conquista.

Regracio **Fabiana Rocha**, a grande parceira que tive em Viçosa, com quem pude compartilhar risos e lágrimas e que foi tão importante, se tornando uma amiga inesquecível.

Agradeço imensamente à **Lorena Monteiro, Caio Monteiro, Edilene Duvanel e Lonardi Vilela**. Tive a imensa sorte de poder contar com a amizade de vocês quando tudo parecia desandar; vocês me deram o carinho que só uma família consegue dar, e serão sempre minha família mineira.

Aline Silvestrini, Fernanda Hertel, Pollyanna Souto e Juliana Rodrigues, com vocês gostaria de não usar formalidades, todavia, para fins de registro mantereí o padrão: muito obrigada pelo apoio que me deram na execução deste estudo, mas quero agradecer principalmente pela amizade, companheirismo e por tudo que pude aprender com cada uma de vocês, e sem dúvida levarei para toda vida!

Minha gratidão à **Iara Ribeiro**, de quem tive total apoio em todas as etapas e sem a qual a execução deste estudo teria sido mais difícil. Obrigada pelo suporte e principalmente pela amizade, que pretendo levar pra sempre.

Na realização do presente estudo, contei com o apoio direto ou indireto de múltiplas pessoas às quais estou profundamente grata. Correndo o risco de injustamente não mencionar algum dos contributos quero deixar expresso os meus agradecimentos:

Aos Professores Dr. **Edvaldo Barros** do NuBioMol/UFV e Dr. **Leandro Licursi** do Departamento de Biologia/UFV;

Aos M.V. **Andrés Ortega** e **Camilo Ramírez** pelo apoio na realização dos exames bioquímicos e da análise proteômica deste estudo;

Ao M.V. **André Lang** e aos estagiários **Paula Campbell** e **Rafael Cardoso** pela preocupação, incentivo e dedicação prestada a este estudo;

Aos funcionários do Departamento de Veterinária da UFV **Claudiomiro, Adão Cardoso, Cláudio Cardoso, Verônica Souza, Francismar Alves, Aécio Oliveira** e **Aluísio**;

À secretária **Rosinéia Cunha**, pelo imenso carinho, atenção e zelo que sempre dispensa a todos os pós-graduandos;

À **Universidade Federal de Viçosa** e ao **Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária** pela oportunidade e por todo conhecimento e experiência proporcionados e à **CAPES**, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Líquido Cefalorraquidiano (LCR)	4
2.1.1 COMPOSIÇÃO DO LCR	4
2.1.2 COLETA DO LCR	5
2.1.3 PROTEÍNAS NO LCR	6
2.2.3.1 <i>Albumina</i>	6
2.2.3.2 <i>Apolipoproteína E</i>	6
2.2.3.3 <i>Prostaglandina D sintase</i>	7
2.2.3.4 <i>α1-antiproteinase</i>	7
2.2.3.5 <i>Imunoglobulina G (IgG)</i>	8
2.2.3.6 <i>Transtirretina</i>	9
2.1.4 CITOCINAS	9
2.2.2 Interleucina 10 (IL10)	10
2.2 Raquianestesia	10
2.3 Ropivacaína	11
2.4 Cetamina s (+)	12
2.5 Dexmedetomidina	13
2.6 Neuroanatomia em coelhos	14
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
4. REFERÊNCIAS	17
5. CAPÍTULO I: Estudo da neurotoxicidade da raquianestesia com ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina em <i>Oryctolagus cuniculus</i>	30
Resumo	31
Introdução	33
Material e Métodos	35

	Análise do líquido cefalorraquidiano	38
	<i>Análise bioquímica</i>	38
	<i>Análise proteômica</i>	38
	<i>Dosagem de IL10</i>	39
	Análise estatística	40
	Resultados	41
	Discussão	46
	Referências	50
6.	CAPÍTULO II: Raquianestesia em coelhos com ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina – Avaliação de bloqueio sensorial e motor	53
	Resumo	54
	Introdução	56
	Material e métodos	58
	<i>Aspectos éticos</i>	58
	<i>Delineamento experimental</i>	58
	<i>Avaliação de bloqueio sensorial e motor</i>	59
	Análise estatística	60
	Resultados	61
	Discussão	65
	Referências	68
7.	CONCLUSÃO GERAL	71
	Anexos	72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1:** Divisão dos grupos experimentais e dosagem de ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina para administração subaracnóidea em cada grupo estudado. **37**
- Tabela 2:** Relação das proteínas identificadas nas bandas analisadas por meio do MALDI TOF/TOF. **42**
- Tabela 3:** Níveis proteicos expressos em mg/dl, antes e após raquianestesia nos grupos estudados. **43**

CAPÍTULO II

- Tabela 1:** Resposta de reflexo sensorial ao pinçamento de dígito e cauda em coelhos submetidos à raquianestesia **62**
- Tabela 2:** Número de pontos vertebrais bloqueados por grupo após a raquianestesia (valores expressos em mediana e intervalo interquartilico) **62**
- Tabela 3:** Tempo de bloqueio motor por grupo após raquianestesia (valores expressos em mediana e intervalo interquartilico) **64**
- Tabela 4:** Escore de bloqueio motor por grupo avaliado em função do tempo **64**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático da vista dorsal da medula espinhal e nervos espinhais associados na região lombossacral (apenas lado direito) após laminectomia dorsal em um coelho com sete vértebras lombares (Esquema modificado de Greenaway et al. (2001). **14**

Figura 2: Desenho esquemático de dermatômos cutâneos da região lombossacra. **15**

CAPÍTULO I

Figura 1: Punção atlanto-occipital em coelho para a obtenção de LCR. **36**

Figura 2: Medula espinhal de coelho, coletada 3 dias após a raquianestesia. **38**

Figura 3: Géis da SDS-PAGE 1D. **42**

Figura 4: Representação gráfica da mensuração de IL 10 (pg/ml) no LCR antes e após a raquianestesia (valores médios por grupo). **44**

Figura 5: Fotomicrografias de cortes transversais das medulas espinhais de coelho três dias após a raquianestesia, corados por hematoxilina e eosina. **45**

CAPÍTULO II

Figura 1: Técnica de raquianestesia e avaliação de nocicepção térmica em membro pélvico de coelho. **60**

Figura 2: Representações gráficas do tempo de antinocicepção térmica e da latência de nocicepção térmica, por grupo avaliado.

63

RESUMO

FERREIRA-ERMITA, Dayana Alerisa Conceição, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Raquianestesia com ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina – estudo da neurotoxicidade e avaliação de bloqueio motor e sensorial em coelho.** Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Coorientadores: Fabrício Luciani Valente e Emily Correna Carlo Reis.

Com o objetivo de estabelecer um protocolo analgésico eficaz e garantir segurança na sua utilização, este estudo propôs analisar e comparar os efeitos analgésicos e neurotóxicos da administração raquidiana da associação entre a ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina em coelhos, por meio da avaliação dos bloqueios motor e sensorial, complementados pela análise bioquímica, proteômica e dosagem de interleucina 10 (IL10) no líquido cefalorraquidiano (LCR), e da investigação histopatológica da medula espinhal. Vinte coelhos da raça Nova Zelândia, foram divididos randomicamente em cinco grupos, com “*n*” igual a quatro, de acordo com os fármacos que foram utilizados para a raquianestesia: grupo controle (GC), no qual administrou-se solução salina 0,9%, grupo cetamina (GCe), grupo dexmedetomidina (GD), grupo ropivacaína (GR) e grupo associação (GRCeD). O procedimento experimental foi conduzido às cegas, por três avaliadores experientes, que desconheciam qual fármaco foi administrado a cada animal avaliado. A resposta a um estímulo nociceptivo progressivo foi utilizada para avaliar o grau e duração do bloqueio sensorial. Adicionalmente, realizou-se o teste de bloqueio da nocicepção térmica por meio da latência de retirada dos membros, e resposta de reflexo cutâneo no dorso (região lombossacral), por contato com uma placa metálica de cobre, aquecida à 60°C. O bloqueio motor dos membros pélvicos foi avaliado por meio de escore qualitativo. O LCR foi coletado imediatamente antes e três dias após a raquianestesia para análise bioquímica, proteômica e dosagem de IL10. Para identificação das proteínas do LCR, utilizou-se a aquisição da espectrometria de massa por MALDI TOF/TOF após a digestão trípica das bandas obtidas nos géis da eletroforese. A dosagem de IL10 foi executada pelo método ELISA. Após três dias, os coelhos foram submetidos à eutanásia e a medula espinhal foi colhida para análise histopatológica. Os resultados alcançados a

partir das avaliações dos bloqueios sensorial e motor demonstraram que associar cetamina e dexmedetomidina à ropivacaína, pela via subaracnóidea, pode potencializar a analgesia fornecida pela ropivacaína, promovendo um bloqueio mais cranial e com efeito prolongado. Este estudo demonstrou que a raquianestesia com a associação de cetamina, dexmedetomidina e ropivacaína é um protocolo de analgesia multimodal eficaz para a rotina em anestesia veterinária, que proporciona potencialização da analgesia em comparação com a utilização isolada da ropivacaína, e pode ser uma escolha quando não se indica utilizar opioides. A utilização dessa associação pela via subaracnóidea é segura e não causa danos ao sistema nervoso central. Com base nos resultados obtidos nas análises do LCR e na avaliação histopatológica da medula espinhal, este protocolo não desencadeia efeitos neurotóxicos e possivelmente pode contribuir com efeitos neuroprotetores. Assim, esta associação tem sua utilização justificada não apenas pelos benefícios analgésicos que estes fármacos podem proporcionar, mas também, pela segurança na sua aplicabilidade.

ABSTRACT

FERREIRA-ERMITA, Dayana Alersa Conceição, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Spinal anesthesia with ropivacaine, ketamine and dexmedetomidine - study of neurotoxicity and evaluation of motor and sensory block in rabbits.** Advisor: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-advisers: Fabrício Luciani Valente and Emily Correna Carlo Reis.

In order to establish an effective analgesic protocol and to guarantee safety in its use, this work proposed to analyze and compare the analgesic and neurotoxic effects of spinal administration of the association between ropivacaine, ketamine and dexmedetomidine in rabbits, through the evaluation of motor and sensory blockade, complemented by biochemical assay, proteomic analysis and interleukin 10 (IL10) quantification in the cerebrospinal fluid (CSF), and histopathological investigation of the spinal cord. Twenty New Zealand rabbits, were randomly divided into five groups, with "n" equal to four, according to the drugs that were used for spinal anesthesia: control group (GC), which was administered saline solution 0.9%, ketamine group (GCe), dexmedetomidine group (GD), ropivacaine group (GR) and association group (GRCeD). The experimental procedure was conducted in a blinded manner, with three experienced evaluators who did not know which drug was administered to each evaluated animal. The response to a standard noxious stimulus was used to assess the degree and duration of sensory blockade. In addition, the thermal nociception blockade test was performed through limb withdrawal latency and cutaneous reflex response on the back (lumbosacral region) by contact with a copper metal plate heated at 60°C. The motor blockade of the pelvic limbs was evaluated by qualitative score. The CSF was collected immediately before and three days after spinal anesthesia for biochemical and proteomic analysis and measurement of IL10. For CSF proteins identification, the acquisition of mass spectrometry was obtained by MALDI TOF / TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight) after tryptic digestion of the bands obtained in electrophoresis gels. The IL10 measurement was performed by ELISA method (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). After three days, the rabbits were submitted to euthanasia and the spinal cord was collected for histopathological

analysis. The results obtained from the sensory and motor blockade assessments, showed that associating ketamine and dexmedetomidine to ropivacaine by subarachnoid route potentiate the analgesia provided by ropivacaine, promoting a more cranial blockage and with prolonged effect. This work showed that spinal anesthesia with ketamine, dexmedetomidine and ropivacaine combination is an effective multimodal analgesia protocol for a veterinary routine anesthesia, which provides potentiation of analgesia compared to the use of ropivacaine alone, and may be a choice when opioids are not indicated. The use of this combination by the subarachnoid route is safe and does not cause damage to the central nervous system. Based on the obtained results in the CSF analyzes, and the histopathological evaluation of the spinal cord, this protocol does not trigger neurotoxic effects and possibly may contribute to a neuroprotective effect. Thus, this association has its use justified not only by the analgesic benefits that these drugs can provide, but also by the safety in their applicability.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Para alcançar a insensibilidade à dor em diversos tipos de intervenções cirúrgicas, o sistema nervoso central (SNC) vem sendo submetido a uma variedade de anestésicos, isoladamente ou em combinações, onde o principal objetivo é "desligar" a comunicação neuronal a fim de alcançar analgesia e hipnose (JEVTOVIC-TODOROVIC, 2016). Os resultados e riscos desta prática têm sido ativamente investigados (HODGSON et al., 1999; GANEM et al., 2003; WARD et al., 2011; LIAN et al., 2017).

Embora a utilização de técnicas anestésicas neuroaxiais venha crescendo nos últimos anos, é pungente compreender os possíveis riscos que esta prática pode trazer, uma vez que, a aplicação direta de terapias distintas na medula espinhal tem o potencial de interromper vias de dor específicas, limitando os efeitos colaterais sistêmicos, mas também traz o risco inerente de lesões ao SNC (HODGSON et al. 1999; GANEM et al., 2003; VRANKEN et al., 2006; LIAN et al., 2017).

A raquianestesia é a técnica na qual se executa a aplicação de um agente anestésico no espaço subaracnoideo, em contato com o líquido cefalorraquidiano (LCR), sendo também denominada anestesia espinhal, intratecal ou subaracnóidea (SOLTÉSZ, 2010). Os dados disponíveis na literatura veterinária sobre a utilização desta técnica são escassos (ABIMUSSI et al., 2017). Portanto, são necessárias pesquisas que visem melhorar a qualidade e prolongar a analgesia, e em paralelo forneçam informações sobre a viabilidade e segurança deste método anestésico na medicina veterinária.

A dor envolve mecanismos múltiplos que requerem tratamento adequado, utilizando técnicas multimodais de analgesia (WHITE e KEHLET, 2010) onde cada agente contribui com determinado efeito farmacológico (OTERO et al., 2016). Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado segurança e eficácia na utilização da ropivacaína quando aplicada a estruturas nervosas por via subaracnóidea (CANTÜRK et al., 2012). Este anestésico local é comumente utilizado para analgesia na medicina humana porque promove menor bloqueio motor (WANGPING e MING, 2017). Associar a cetamina à ropivacaína pode melhorar a qualidade analgésica, uma vez que o antagonismo aos receptores N-metil-d-aspartato (NMDA), produzido pela

cetamina, pode prevenir estados de hiperexcitabilidade no SNC, reduzindo ainda mais a condução nociceptiva (JONES et al., 2001). Adicionalmente, a cetamina interage com os canais de sódio mimetizando efeitos atribuídos aos anestésicos locais (WAGNER II et al., 2001).

Outra forma de potencializar o efeito analgésico dos anestésicos locais tem sido demonstrada nos últimos anos e consiste na associação com a dexmedetomidina, um potente agonista α -2 adrenérgico, altamente seletivo, com propriedades simpatolíticas, sedativas, amnésicas (CAROLLO et al., 2008; GIOVANNITTI Jr et al., 2015; SANKARARAO e BHAIKAVABHATLA, 2017) e analgésicas, tal que permite que ela seja descrita como um poupador de opioides (PANZER et al., 2009).

Com o objetivo de estabelecer um protocolo analgésico eficaz e garantir segurança na sua utilização, este estudo propôs analisar e comparar os efeitos analgésicos e neurotóxicos da administração raquidiana da associação entre a ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina em coelhos, por meio da avaliação dos bloqueios motor e sensorial, complementados pela análise bioquímica, proteômica e dosagem de interleucina 10 (IL10) no LCR, e da avaliação histopatológica da medula espinhal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A compreensão da neurofarmacologia tem sido despertada para um interesse intenso no uso de drogas espinhais na anestesia e no controle da dor, em função das vantagens que a aplicação de fármacos que possuem receptores na medula espinhal pode trazer. Entretanto, o risco de lesão ao SNC é um fator que deve ser cuidadosamente considerado, sendo assim, a neurotoxicidade dos medicamentos administrados pela via subaracnoidea é uma questão que deve ser investigada e estudada profundamente (HODGSON et al., 1999; WARD et al., 2011; LIAN et al., 2017).

A toxicidade da medula espinhal pode manifestar-se como distúrbios histológicos, fisiológicos e/ou comportamentais (dor, déficits e disfunções motoras e sensoriais) após a exposição espinhal a um medicamento (GANEM et al., 2003; VRANKEN et al., 2006; LIAN et al., 2017). Estudos com pequenos roedores têm mostrado que a exposição precoce à anestesia, em fase de desenvolvimento do SNC resulta em depleção neuronal (NIKIZAD et al., 2007; RIZZI et al., 2008) e comprometimento de longa duração das sinapses em regiões vulneráveis do cérebro (BRINER et al., 2010; LUNARDI et al., 2010). As alterações morfológicas descritas na literatura representam mudanças substanciais na estrutura neuronal que podem ser detectadas facilmente usando avaliações histológicas (GANEM et al., 2003; VRANKEN et al., 2006; LIAN et al., 2017). Adicionalmente, é possível detectar alterações que indicam o envolvimento da cascata inflamatória na lesão do SNC por meio da expressão de moléculas de adesão específicas, fatores quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias (SILVEIRA e PROCIANOY, 2003).

A taxa de produção do LCR e a sua composição podem ser prejudicados pela presença de tumores, isquemias, por infecções, traumas e/ou intervenções traumáticas (WEAVER et al., 2004; ENNIS e KEEP, 2006; JOHANSON et al., 2008), e a análise laboratorial do LCR aprovisiona informações fundamentais para uma conduta clínica eficiente (JOHANSON et al., 2008).

2.1 Líquido cefalorraquidiano (LCR)

A análise do LCR tem sido importante para diagnosticar diversos tipos de alterações, sejam elas infecciosas (NIGROVIC et al., 2002; AMINPOUR et al., 2005; MUKAI et al., 2006), metabólicas (LUTZ et al., 2007; SINCLAIR et al., 2010), imunes (BECHTER et al., 2010), neoplásicas (GLANTZ et al., 1998) ou traumáticas (LEVINE et al., 2006), uma vez que citocinas e proteínas de fase aguda, relacionadas à estas alterações no SNC, podem ser encontradas no LCR.

O LCR efetua a excreção de subprodutos potencialmente tóxicos do metabolismo cerebral, assegurando que os fluidos que banham as células do SNC tenham uma composição química bem regulada (TERLIZZI e PLATT, 2006). Essa excreção é uma importante função, porque os neurônios requerem uma composição iônica adequada no espaço extracelular, sendo muito menos tolerantes a alterações do que outros tipos celulares (GIZA e HOVDA, 2001; ANNUNZIATO et al. 2003). Além disso, o LCR exerce, também, um papel protetivo ao SNC ajudando a modular flutuações normais na pressão intracraniana, protegendo mecanicamente, e atuando no transporte intracerebral de substâncias biologicamente ativas (TERLIZZI e PLATT, 2006).

2.1.1 COMPOSIÇÃO DO LCR

O epitélio do plexo coroide é responsável por dois terços do LCR produzido (JOHANSON et al., 2011), em uma taxa estimada de 0,052 ml/min em cães (OPPELT et al., 1964), 0,015 ml/min em gatos (HOCHWALD et al., 1969), 0,00037 ml/min em ratos, 0,305 ml/min em humanos adultos (HUANG et al., 2004) e 0,013 ml/min em coelhos (POLLAY e CURL, 1967).

O LCR é produto da ultrafiltração do plasma e contém uma grande variedade de proteínas, em baixa quantidade (TERLIZZI e PLATT, 2006), das quais 85% provém do sangue, por exemplo, albumina e imunoglobulina G (IgG), enquanto aproximadamente 15% são sintetizadas primariamente no cérebro (REIBER, 2001), como a prostaglandina D sintase, a proteína mais abundante produzida pelo SNC (KILLER et al., 2006).

Em geral, o LCR tem aspecto claro e incolor e é quase acelular, contendo 99% de água (JOHANSON et al., 2011). Vários íons, enzimas e outras substâncias também podem ser encontrados no LCR normal (TERLIZZI e PLATT, 2006). Apresenta maior concentração de magnésio e íons clorídricos e menor concentração de glicose, ácido úrico, cálcio e fosfato, quando comparado ao plasma sanguíneo (JOHANSON et al., 2011).

2.1.2 COLETA DO LCR

Em humanos, existem três vias clássicas para coleta do LCR: sendo a lombar a mais utilizada na rotina, seguida pela via suboccipital ou cisternal e, por último, a via ventricular (COMAR et al., 2009). Li et al. (2012) comparando em coelhos esses três métodos usuais, os quais denominaram punção lombar, punção da membrana atlanto-occipital e perfuração do crânio, sugeriram que a punção da membrana atlanto-occipital é o melhor método de coleta para esta espécie, apesar de terem obtido uma taxa de sucesso de aproximadamente 52%, coletando por esta via 0,5 ml de LCR de cada animal. Os autores consideraram a simplicidade, facilidade e repetibilidade da técnica. Segundo Chen et al. (2016), a taxa de sucesso da punção atlanto-occipital em coelhos pode ser melhorada quando auxiliada por ultrassonografia.

A técnica de punção da membrana atlanto-occipital consiste na inserção de uma agulha hipodérmica entre a protuberância occipital e o atlas, em um ponto de depressão que pode ser confirmado por meio da palpação e então a agulha pode ser inserida de forma lenta e cuidadosa ao longo da borda superior do atlas, sendo manuseada para que não fique tão profunda ao ponto de lesar a medula oblonga (LI et al., 2012).

A contraindicação mais importante para a coleta do LCR é a hipertensão intracraniana, devido ao risco de herniação tonsilar ou do SNC. Outras contraindicações são infecções locais no local da punção, anormalidades congênitas e diátese hemorrágica não corrigida (NIEMANTSVERDIET et al., 2015).

2.1.3 PROTEÍNAS NO LCR

2.1.3.1 *Albumina*

Consta de um peptídeo formado por 585 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 69 kDa e meia vida variando de 14-20 dias. É a proteína encontrada em maior quantidade no meio extracelular e possui inúmeras funções orgânicas dentre as quais destacam-se: manutenção da pressão osmótica do plasma, efeitos antitrombóticos e inibidores da função plaquetária, além de servir como molécula carreadora de outras proteínas, de minerais, medicamentos e outras substâncias orgânicas insolúveis (DON e KAYSEN, 2004).

Nos quadros inflamatórios agudos sistêmicos normalmente seus valores encontram-se diminuídos, sendo a principal proteína de fase aguda negativa do plasma. A diminuição da concentração de albumina se dá por meio das perdas pelo trato gastrointestinal, na urina por alteração da filtração glomerular e pela diminuição da síntese hepática (KANEKO et al., 2008). Essa proteína também serve de fonte de aminoácidos para a formação de outras proteínas de fase aguda de caráter positivo (PALTRINIERI, 2008).

Como já dito, a concentração de proteínas no LCR é muito baixa, aproximadamente 0,5% da concentração sérica, e desta, 90% é formada, principalmente, pela albumina, que diferentemente do que ocorre no sangue, em casos de inflamação aguda, tende a aumentar a concentração líquórica. Essa elevação da albumina no LCR se deve ao aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) nos quadros inflamatórios do sistema nervoso, pois a albumina é produzida exclusivamente no fígado, logo, sua concentração líquórica reflete o grau de comprometimento da seletividade da BHE (TERLIZZI e PLATT, 2006).

2.1.3.2 *Apolipoproteína E*

A apolipoproteína E (apoE) é uma proteína polimórfica proveniente de três alelos em um único loco gênico. As três principais isoformas são a apoE4, apoE3 e apoE2 (MAHLEY e RALL Jr., 2000). Identificada em 1974, teve seu papel associado ao metabolismo lipídico (SHORE e SHORE, 1974). Foi reconhecida inicialmente como um dos principais determinantes no

metabolismo de lipoproteínas e doenças cardiovasculares. Havendo progresso na compreensão de sua função, emergiu como uma importante molécula em vários processos biológicos, não diretamente relacionados à função de transporte lipídico, incluindo doença de Alzheimer, função cognitiva, imunorregulação e possivelmente até doenças infecciosas (MAHLEY e RALL Jr., 2000). Sua função no SNC só foi descrita mais recentemente. A apoE tem sido relacionada à imunidade inata, ao funcionamento cerebral normal e a inúmeras doenças neurodegenerativas (ORTH e BELLOSTA, 2012).

Não existe intercâmbio entre a apoE plasmática e a apoE do SNC devido a BHE (MAHLEY e RALL Jr., 2000). A apoE do SNC é sintetizada localmente pelo cérebro, e ela atua na manutenção e reparo neuronal (MAHLEY et al., 2006). As apolipoproteínas quando sintetizadas podem ser clivadas por proteases e os fragmentos de apoE são deletérios para esse processo de manutenção e reparo. A apoE4 exerce um papel neurotóxico em culturas de neurônios além de causar alterações degenerativas (MAHLEY et al., 2006).

2.1.3.3 *Prostaglandina D sintase*

A prostaglandina D sintase (PGDS) é a proteína sintetizada no SNC mais abundante no LCR. Tem a capacidade de catalisar a prostaglandina H2 (PGH2) à prostaglandina D2 (PGD2), uma proteína pró-inflamatória (HUANG et al., 2009).

No SNC, a PGD2 está envolvida na regulação do sono (HAYAISHI e URADE, 2002) e na modulação das respostas à dor (EGUCHI et al., 1999). Processos inflamatórios resultam em síntese aumentada de PGDS (MARQUES et al., 2007) e biossíntese reforçada de PGD2 (GUAY et al., 2004) no SNC. Embora o mecanismo exato de como a PGDS está envolvida na inflamação ou modulação da imunidade no SNC ainda não seja claro, sabe-se que a PGDS é capaz de promover o processo inflamatório através da ativação da PGD2 (HUANG et al., 2009).

2.1.3.4 *α 1-antiproteinase*

A α 1-antiproteinase é uma glicoproteína de 52 kDa, formada por uma cadeia de 394 aminoácidos e três cadeias laterais de carboidratos. O gene

que expressa estas proteínas encontra-se quase que exclusivamente nos hepatócitos, podendo gerar três isoformas: F, S e E (SAITO e SINOHARA, 1995). É o inibidor de proteases mais abundante do organismo. Em humanos sua concentração pode variar de 120-200 mg/dl e a capacidade secretória do fígado pode aumentar em até cinco vezes no curso de quadros inflamatórios, neoplásicos e infecciosos (VIDAL et al., 2006).

A função mais estudada da α 1-antiproteinase é a inibição da tripsina, entretanto é capaz de inibir a maioria da serinoproteinases produzidas pelos neutrófilos, também tem potencial inibitório contra os leucotrienos B4 e a interleucina 8, ambos potentes quimiotaxores (BRANTLY, 2002). Nos casos de neoplasias no sistema nervoso e de meningite bacteriana a concentração de α 1-antiproteinase pode apresentar-se aumentada mp LCR (GALVEZ et al., 1979; PARADOWSKI et al., 1995).

2.1.3.5 *Imunoglobulina G (IgG)*

As principais proteínas circulantes são a albumina e as globulinas. Destas últimas, a Imunoglobulina G (IgG) é a que se encontra em maior quantidade, compondo em média 75%, das globulinas presentes no sangue (GUYTON e HALL, 2016). Por isso, a IgG é o principal mediador primário da resposta imune humoral contra os mais variados antígenos. Todavia, também pode desencadear respostas autoimunes, agindo como uma molécula citotóxica ou como um imunocomplexo, semelhante ao que ocorre na trombocitopenia imunomediada, na anemia hemolítica autoimune e no lúpus eritematoso sistêmico (NIMMERJAHN e RAVETCH, 2007).

Após o isolamento da IgG em laboratório, e sua purificação, passou a ser utilizada no tratamento de várias doenças autoimunes como a síndrome de Guillain-Barré, dadas as suas propriedades neuroprotetores. O mecanismo exato ainda não está plenamente esclarecido e parece ser uma associação de múltiplas vias que passam pela modulação da IgG. No dano medular, acredita-se que o efeito neuroprotetor da IgG administrada por via intravenosa, seja decorrente da indução da apoptose leucocitária e pela neutralização de alguns componentes do sistema complemento (FEHLINGS e NGUYEN, 2010).

2.1.3.6 *Transtirretina*

É uma proteína de 55 kDa constituída de 127 aminoácidos (KANDA et al., 1974; SOPRANO et al., 1985), sintetizada principalmente no fígado, rins e plexo coroide, com meia vida média de 24h, sendo eliminada via filtração glomerular por meio da urina (MAKOVER et al., 1988; SOUSA et al., 2000a). O nome transtirretina é derivado das suas duas principais funções: o transporte do hormônio tireoídiano tiroxina e o transporte de retinol (vitamina A), este último pela formação do complexo de ligação retinol:transtirretina (RAZ et al., 1970; ANDREA et al., 1980).

Especificamente no sistema nervoso, a transtirretina desempenha inúmeras funções como uma possível modulação no sistema noradrenérgico, demonstrado em ratos que apresentaram diminuição dos sinais depressivos e um aumento da atividade de exploração (SOUSA et al., 2000b); e age na sinalização do retinol melhorando a manutenção das atividades cognitivas durante a senilidade (BROUILLETTE et al., 2008). Também tem sido estudado a participação da transtirretina no controle da agregação do peptídeo β -amiloide, que parece melhorar a estabilidade do complexo dificultando a formação de amiloide (SCHWARZMAN et al., 1994). Borish et al. (1992) afirma que a transtirretina é capaz de inibir a formação de interleucina 1 em casos de inflamação sistêmica.

2.1.4 CITOCINAS

As citocinas são proteínas de baixo peso molecular, produzidas e secretadas pelos monócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, e no SNC são produzidas e secretadas pela microglia ativada e pelos astrócitos (KRAYCHETE et al., 2006). As citocinas e os fatores neurotróficos são os principais mediadores envolvidos em vias de ativação neuroimunes e cascatas em vários modelos de dor crônica pré-clínica. Um grande número de citocinas vêm sendo estudado, e existem várias subdivisões baseadas em diferentes propriedades pró e anti-inflamatórias. As citocinas podem modular a expressão e a secreção de outras citocinas, atenuando ou agravando quadros inflamatórios (BJURSTROM; GIRON; GRIFFIS, 2014).

2.1.4.1 *Interleucina 10 (IL10)*

A IL10 é uma importante citocina imunorreguladora, anti-inflamatória. Sua principal função biológica envolve a limitação das respostas inflamatórias. No entanto, estudos recentes sugerem que a IL-10 também medeia propriedades imunoestimuladoras que ajudam a eliminar partículas infecciosas e não infecciosas com inflamação limitada (ASADULLAH et al., 2003).

Há duas décadas o potencial neuroprotetor da IL10 já ganhava destaque. Bethea et al. (1999) demonstraram efeitos neuroprotetores desta interleucina após lesão medular (LM) em ratos. A neuroproteção foi avaliada usando desfechos comportamentais e morfológicos. Neste estudo, os autores determinaram que a LM induziu a expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na medula espinhal e a administração de IL-10 reduziu significativamente a expressão dessa citocina. Adicionalmente demonstraram que uma única injeção de IL-10 melhorou significativamente a função motora dos membros pélvicos e reduziu o volume da lesão em aproximadamente 49% dois meses após o trauma. Estes achados reforçam a ideia de neuroproteção induzida pela IL10.

2.2 Raquianestesia

A raquianestesia é usualmente a técnica de escolha em humanos submetidos à cirurgias ortopédicas em membros pélvicos, na qual injeta-se um anestésico no espaço subaracnóideo, em contato com o LCR (LEE et al., 2017). É uma técnica cuja segurança, eficácia e economia justificam sua utilização (PARMAR et al., 2017). Este método de bloqueio tem sido aprimorado há mais de 100 anos (BABCOCK, 1928). Mesmo assim, ainda é uma técnica pouco utilizada e estudada na medicina veterinária (ABIMUSSI et al., 2017).

Em 2015, Sarotti et al. comparando a raquianestesia e o bloqueio epidural, comumente utilizado na rotina veterinária, avaliaram a taxa de falha de procedimento, a necessidade de analgesia de resgate intra-operatória e o tempo de resolução do bloqueio motor pós-operatório em cães anestesiados para cirurgia ortopédica de membro pélvico. Os autores demonstraram que a

raquianestesia apresentou menores taxas de falha que a técnica epidural, menor risco de resposta cardiovascular intraoperatória à estimulação cirúrgica e resolução mais precoce do bloqueio motor, com uma incidência similar de efeitos colaterais.

Diversos fatores influenciam no sucesso da raquianestesia, dentre eles, a variação individual na quantidade de LCR, e a diferença entre a densidade do LCR e do anestésico utilizado para o bloqueio. Este segundo, implicará no tipo de bloqueio (sensorial ou motor / uni ou bilateral) e conseqüentemente nas suas alterações sistêmicas (ABIMUSSI et al., 2017).

Esta técnica tem como principais efeitos adversos a ocorrência de bradicardia e hipotensão, todavia, essas alterações são influenciadas pelo decúbito do paciente durante a execução do bloqueio e pelo local de administração, permitindo a dispersão mais cranial do anestésico, pela relação volume-concentração-dose e tipo de agente administrado. Por outro lado, a raquianestesia traz vantagens como a possibilidade de realização de procedimentos com o paciente acordado ou levemente sedado, e a utilização de doses de anestésico local menor comparada a anestesia epidural (GOUVEIA, 2001).

2.3 Ropivacaína

A ropivacaína é um anestésico local do tipo aminoamida, produzido como um enantiômero-S puro, o que lhe confere menor toxicidade. O período de latência é de 10 minutos, semelhante à lidocaína. É um dos primeiros anestésicos locais de longa duração (180 a 480 min) (KLAUMANN et al., 2013). Sua ação é restrita ao local de aplicação e reverte-se rapidamente ao diminuir sua concentração, que, aliado à sua baixa toxicidade sistêmica, fez da ropivacaína uma opção interessante para a realização de bloqueios nervosos, tanto centrais quanto periféricos (OTERO, 2005; KLAUMANN et al., 2013).

A ropivacaína causa inibição reversível do influxo de íon sódio, bloqueando a condução do impulso nas fibras nervosas. Essa ação é potencializada pela inibição dose-dependente dos canais de potássio. Por ser mais lipofílica que a bupivacaína, tem menor probabilidade de penetrar fibras motoras mielinizadas grandes; portanto, tem ação seletiva sobre as fibras A δ

e C transmissores de dor, em vez de fibras A β , que estão envolvidas na função motora (KUTHIALA e CHAUDHARY, 2011).

Este agente tem sido amplamente utilizado em humanos pela via epidural para o controle da dor, em função do menor bloqueio motor e da estabilidade hemodinâmica (WANGPING e MING, 2017). Os bloqueios motor e sensorial produzidos pela ropivacaína são dose-dependentes. Doses e concentrações baixas promovem analgesia confiável pelo bloqueio de fibras A δ e C, com bloqueio motor mínimo e não progressivo (KLAUMANN et al., 2013).

2.4 Cetamina S (+)

A cetamina, um anestésico injetável rotineiramente utilizado em diversas espécies, é um antagonista não competitivo do receptor NMDA (JONES et al., 2001). Também interage com outros receptores e canais, incluindo receptores de acetilcolina, nicotínicos e muscarínicos, receptores opioides, receptores monoaminérgicos (PELTONIEMI et al., 2016) e atua em canais de sódio de uma maneira semelhante aos anestésicos locais (WAGNER II et al., 2001).

Além dos seus efeitos em diferentes tipos de receptores, estudos têm relatado que ela tem efeitos anti-inflamatórios, e modula a produção de diferentes mediadores pró-inflamatórios (DALE et al., 2012; LU et al., 2016). Todos estes atributos fazem com que a cetamina seja relatada como uma droga complexa, rica em propriedades que a tornam interessante para o controle da dor. Há boas evidências de que a cetamina reduz os escores de dor e a necessidade de opioides (BELL e KALSO, 2018).

A molécula de cetamina possui dois enantiômeros ópticos, S (+) cetamina e R (-) cetamina, com diferentes potências que já eram relatadas em 1970. Entretanto, somente no início dos anos 90 os isômeros ópticos da cetamina foram minuciosamente estudados para desenvolver um agente anestésico mais sofisticado do que a cetamina racêmica (PELTONIEMI et al., 2016).

Com a disponibilidade do enantiômero S (+), o uso de cetamina aumentou nos últimos anos em vários contextos clínicos, com novos esquemas utilizando dosagens subanestésicas e diferentes modalidades de

administração e o surgimento de cetamina S (+) pode oferecer algumas vantagens em comparação com o enantiômero R (-) (ADAMS e WERNER, 1997; MION e VILLEVIEILLE, 2013; FANTA et al., 2015).

O isômero S (+) da cetamina tem uma afinidade maior para o receptor NMDA do que o composto racêmico e, assim, doses menores são requeridas para produzir anestesia e analgesia [4]. A cetamina S (+) é duas e quatro vezes mais potente como anestésico e analgésico do que a forma racêmica e o isômero R (-), respectivamente (ARENDRT-NIELSEN et al., 1996; MION e VILLEVIEILLE, 2013).

2.5 Dexmedetomidina

A dexmedetomidina é o agente α_2 -agonista mais recentemente desenvolvido e comercializado. Em humanos, tem-se sugerido que a medula espinhal é provavelmente o principal local de ação analgésica desta classe farmacológica (AFONSO e REIS, 2012). Atua nos receptores α_2 no corno dorsal da medula espinhal, podendo melhorar a qualidade de bloqueios neuroaxiais por inibir os neurônios nociceptivos, reduzindo a liberação de substância P (GIOVANNITTI Jr et al., 2015). Possui a capacidade de diminuir o fluxo simpático do SNC de forma dose dependente e tem efeito analgésico tal que permite que ela seja descrita como um poupador de opioides (PANZER et al., 2009).

A dexmedetomidina produz efeitos tanto no sistema nervoso central quanto periférico. O efeito sedativo é alcançado por uma redução na atividade dos neurônios no *locus coeruleus*, mas, sua atuação nesta estrutura cerebral é também, responsável pela ocorrência de efeitos eufóricos, relatados em ratos (GIOVANNITTI Jr et al., 2015).

A utilização da dexmedetomidina como sedativo e como analgésico adjuvante em bloqueios neuroaxiais tem sido amplamente estudada nos últimos anos (GIOVANNITTI Jr et al., 2015; GRANT et al., 2015; DEBBARMA et al., 2017; SANKARARAO e BHAIKAVABHATLA, 2017). Sua associação com anestésicos locais tem promovido aumento no tempo de bloqueio sensorial e motor (BRUMMET et al., 2011; SANKARARAO e BHAIKAVABHATLA, 2017). Adicionalmente, outras propriedades também têm sido atribuídas à esta droga. Estudos têm demonstrado efeitos anti-

inflamatórios e neuroprotetores da dexmedetomidina em casos de hipóxia cerebral e hemorragia subaracnoidea (REN et al., 2016; WANG et al., 2016).

2.6 Neuroanatomia em coelhos

A anatomia da medula espinhal do coelho é similar à de outros mamíferos. A piamater é a meninge que envolve intimamente a medula, seguida pela aracnoide e a duramater. O espaço epidural situa-se acima da duramater e o subaracnoideo entre a aracnoide e a piamater (OSOFISKY et al., 2007).

Segundo Greenaway et al. (2001), a coluna vertebral de coelhos pode apresentar variações quanto ao número de vértebras torácicas e lombares, podendo variar entre 12 a 13 vértebras torácicas e seis a sete vértebras lombares. Segundo estes autores, a maioria dos coelhos possui 12 vértebras torácicas e sete vértebras lombares, e a medula espinhal termina na segunda vértebra sacral em 80% dos coelhos, conforme a figura 1A, semelhante aos felinos. Em coelhos com este padrão, os nervos femoral, obturador, ciático e pudendo são formados pelas raízes nervosas originadas respectivamente, em L4, L5 e L6; L6 e L7; L6, L7, S1 e S3; e, S2 e S3 (Fig. 1B).

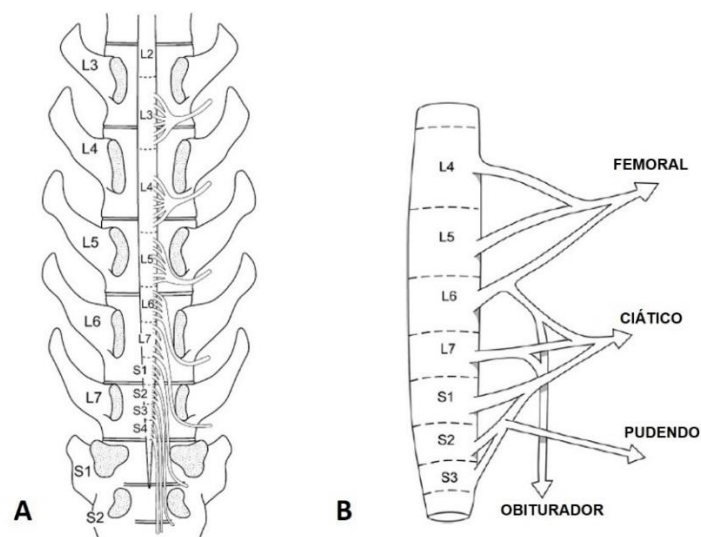


Figura 1: Desenho esquemático da vista dorsal da medula espinhal e nervos espinhais associados na região lombossacral (apenas lado direito) após laminectomia dorsal em um coelho com sete vértebras lombares (Esquema modificado de Greenaway et al. (2001). **(A)** Observe a origem das raízes nervosas espinhais ao longo da medula e a saída de cada nervo espinhal da coluna vertebral; **(B)** Contribuição das raízes nervosas lombossacrais para a formação dos nervos dos membros pélvicos e períneo de um coelho doméstico da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*).

Testes sensoriais nos dermatômos correspondentes às raízes nervosas que emergem da medula espinal podem ser utilizados para a localização segmentar de nervos afetados por um bloqueio anestésico, e têm sido utilizados em pesquisas na área da anestesiologia (LIU et al., 1995; WOLFF et al., 2001; LEE et al., 2008). O mapeamento dos dermatômos de coelhos ainda não foi bem definido na literatura, estima-se, de acordo com Greenaway et al. (2001), que as vias da medula espinal nesta espécie se assemelham às vias das espécies felina (Fig. 2A) e equina (Fig. 2B).

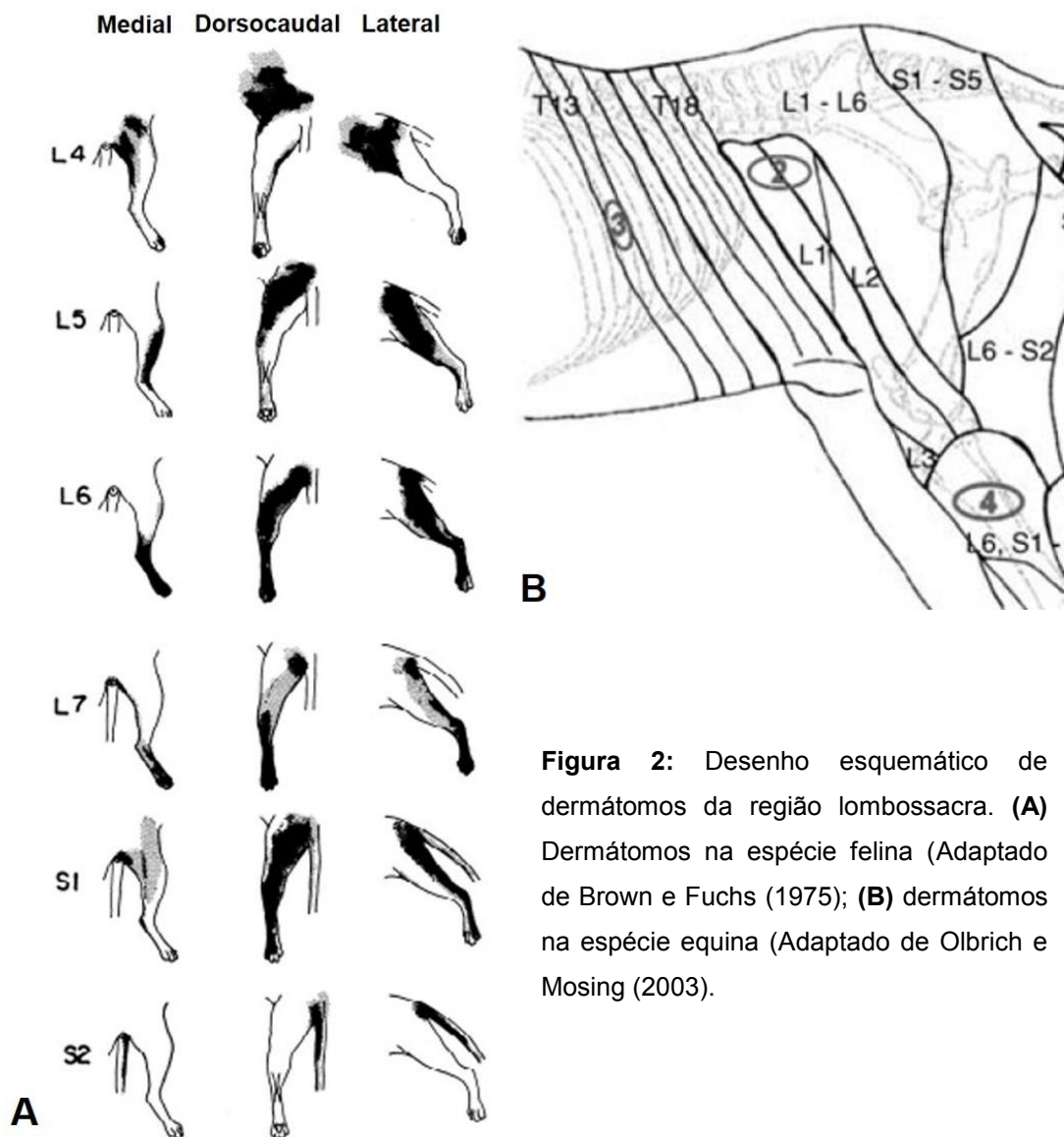


Figura 2: Desenho esquemático de dermatômos da região lombossacra. **(A)** Dermatômos na espécie felina (Adaptado de Brown e Fuchs (1975)); **(B)** dermatômos na espécie equina (Adaptado de Olbrich e Mosing (2003)).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação de diferentes classes farmacológicas em bloqueios neuroaxiais tem sido uma realidade na anestesiologia visando a potencialização e maior duração da analgesia e a redução dos efeitos colaterais sistêmicos (VIEIRA et al., 2004; HAMILTON et al., 2005; NOUR et al., 2013; WANGPING e MING, 2017). A raquianestesia é utilizada e estudada na medicina humana há muitas décadas, associando de forma segura anestésicos que atuam em diferentes receptores. No entanto, sua utilização na medicina veterinária tem sido pouco estudada, e os dados sobre a qualidade anestésica, bem como o perigo de lesão neurológica ainda são vagos. Dentre os poucos estudos veterinários utilizando este bloqueio, foram evidenciadas vantagens na utilização da raquianestesia em comparação com o bloqueio epidural em cães (SAROTTI et al., 2015), todavia, estudos de neurotoxicidade têm demonstrado que esta técnica pode não estar isenta de riscos, considerando, dentre outros fatores, os fármacos utilizados, a concentração e o volume (GANEM et al., 2003; VRANKEN et al., 2006; LIAN et al., 2017).

Neste cenário é indispensável que se compreendam os possíveis riscos relacionados tanto à técnica quanto às associações farmacológicas, porque mesmo trazendo vantagens relacionadas ao protocolo anestésico, não é desejável a ocorrência de toxicidade ao sistema nervoso central, e tal possibilidade deve ser investigada. Conforme descrito anteriormente, a análise do LCR pode fornecer dados sobre possíveis alterações provocadas ao SNC, a partir da investigação de citocinas e PFAs e da avaliação bioquímica. Adicionalmente, a investigação histológica da medula espinhal pode evidenciar lesões resultantes de toxicidade às células nervosas.

Com a finalidade principal de estudar os efeitos neurofarmacológicos da associação entre a ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina, administradas pela via subaracnoidea, e desenvolver estratégias de neuroproteção a partir do conhecimento bioquímico e celular-humoral das possíveis lesões ao SNC provocadas pela técnica ou pelos anestésicos, é pungente o desenvolvimento deste estudo.

4. REFERÊNCIAS

ABIMUSSI, C. J. X.; FLORIANO, B. P.; WAGATSUMA, J. T.; CANCELI, C. H. B.; FERREIRA, J. Z.; GARCIA-PEREIRA, F. L.; SANTOS, P. S. P.; OLIVA, V. N. L. S. Eficácia e efeitos hemodinâmicos da anestesia raquidiana com ropivacaína isobárica, hipobárica ou hiperbárica em cães anestesiados com isoflurano. **Pesq Vet Bras**, v. 37, n. 2, p. 137-144, 2017.

ADAMS, H. A.; WERNER, C. From the racemate to the eutomer: (S)-ketamine. Renaissance of a substance? **Anaesthesist**, v. 46, p. 1026-1042, 1997.

AFONSO, J.; REIS, F. Dexmedetomidine: Current Role in Anesthesia and Intensive Care. **Rev Bras Anest**, v. 62, n. 1, p. 118-133, 2012.

AMINPOUR, S.; TINLING, S. P.; BRODIE, H. A. Role of Tumor Necrosis Factor- α in Sensorineural Hearing Loss after Bacterial Meningitis. **Otol Neurotol**, v. 26, n. 4, p. 602-609, 2005.

ANDREA, T. A.; CAVALIERI, R. R.; GOLDFINE, I. D.; JORGENSEN, E. C. Binding of thyroid hormones and analogs to the human plasma protein prealbumin. **Biochemistry**, v. 19, n. 1, p. 55-63, 1980.

ANNUNZIATO, L.; AMOROSO, S.; PANNACCIONE, A.; CATALDI, M.; PIGNATARO, G.; D'ALESSIO, A.; SIRABELLA, R.; SECONDO, A.; SIBAUD, L.; RENZO, G. F. Apoptosis induced in neuronal cells by oxidative stress: role played by caspases and intracellular calcium ions. **Toxicol Lett**, v. 139, n. 2-3, p. 125-133, 2003.

ARENDRT-NIELSEN, L.; NIELSEN, J.; PETERSEN-FELIX, S.; SCHNIDER, T. W.; ZBINDEN, A. M. Effect of racemic mixture and the (S+)-isomer of ketamine on temporal and spatial summation of pain. **Br J Anaesth**, v. 77, n. 5, p. 625-631, 1996.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 Therapy-Review of a New Approach. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 2, p. 241-269, 2003.

BABCOCK, W. W. Spinal anesthesia. **Am J Surg**, v. 5, n. 6, p. 571-576, 1928.

BECHTER, K.; REIBER, H.; HERZOG, S.; FUCHS, D.; TUMANI, H.; MAXEINER, H. G. Cerebrospinal fluid analysis in affective and schizophrenic spectrum disorders: Identification of subgroups with immune responses and blood–CSF barrier dysfunction. **J Psychiatry Res**, v. 44, n. 5, p. 321-330, 2010.

BELL, R. F.; KALSO, E. A. Ketamine for pain management. **Pain**, v. 3, p. e674, 2018. Acesso em 12 de dezembro de 2018: <http://journals.lww.com/painrpts>

BETHEA, J. R.; NAGASHIMA, H.; ACOSTA, M. C.; BRICENO, C.; GOMEZ, F.; MARCILLO, A. E.; LOOR, K.; GREEN, J.; DIETRICH, W. D. Systemically Administered Interleukin-10 Reduces Tumor Necrosis Factor-Alpha Production and Significantly Improves Functional Recovery Following Traumatic Spinal Cord Injury in Rats. **J Neurotrauma**, v. 16, n. 10, p. 851-863, 1999.

BJURSTROM, M. F.; GIRON, S. E.; GRIFFIS, C. A. Cerebrospinal Fluid Cytokines and Neurotrophic Factors in Human Chronic Pain Populations: A Comprehensive Review. **Pain Pract**, v. 16, n. 2, p. 183-203 2016.

BORISH, L.; KING, M. S.; MASCALI, J. J.; JOHNSON, S.; COLL, B., Rosenwasser, L.J. Transthyretin is an inhibitor of monocyte and endothelial cell interleukin-1 production. **Inflammation**, v. 16, n. 5, p. 471-484, 1992.

BRANTLY, M. α 1-Antitrypsin: not just an antiprotease: extending the half-life of a natural anti-inflammatory molecule by conjugation with polyethylene glycol. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 27, n. 6, p. 652-654, 2002.

BRINER, A.; DE ROO, M.; DAYER, A.; MULLER, D.; HABRE, W.; VUTSKITS, L. Volatile Anesthetics Rapidly Increase Dendritic Spine Density in the Rat Medial Prefrontal Cortex during Synaptogenesis. **Anesthesiology**, v. 112, n. 3, p. 546-556, 2010.

BROUILLETTE, J.; QUIRION, R. Transthyretin: a key gene involved in the maintenance of memory capacities during aging. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 11, p. 1721-1732, 2008.

BROWN, P. B.; FUCHS, J. L. Somatotopic representation of hindlimb skin in cat dorsal horn. **J Neurophysiol**, v. 38, n. 1, p. 1-9, 1975.

BRUMMETT, C. M.; HONG, E. K.; JANDA, A. M.; AMODEO, F. S.; LYDIC, R. Perineural Dexmedetomidine Added to Ropivacaine for Sciatic Nerve Block in Rats Prolongs the Duration of Analgesia by Blocking the Hyperpolarization-activated Cation Current. **Anesthesiology**, v. 115, n. 4, p. 836-843, 2011.

CANTÜRK, M.; KILCI, O.; ORNEK, D.; OZDOGAN, L.; PALA, Y.; SEN, O.; DIKMEN, B. Ropivacaína para Raquianestesia Unilateral: Hiperbárica ou Hipobárica? **Rev Bras Anest**, v. 62, n. 3, p. 298-311, 2012.

CAROLLO, D. S.; NOSSAMAN, B. D.; RAMADHYANI, U. Dexmedetomidine: a review of clinical applications. **Curr Opin Anaesthesiol**, v. 21, n. 4, p. 457-461, 2008.

CHEN, Y.; ZHU, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; LIAN, J.; LUO, F.; DENG, X.; WONG, K. K. L. Ultrasound guided double injection of blood into cisterna magna: a rabbit model for treatment of cerebral vasospasm. **Biomed Eng online**, v. 15, n. 1, p. 19, 2016.

COMAR, S.R.; ARAÚJO MACHADO, N.; DOZZA, T.G.; HAAS, P. Análise citológica do líquido cefalorraquidiano. **Estudos de Biologia**, v. 31, n. 73-75, 2009.

DALE, O.; SOMOGYI, A. A.; LI, Y.; SULLIVAN, T.; SHAVIT, Y. Does intraoperative ketamine attenuate inflammatory reactivity following surgery? A systematic review and meta-analysis. **Anesth Analg**, v. 115, n. 4, p. 934-943, 2012.

DEBBARMA, M. K.; MEITEI, A. J.; SINGH L, P.; RAJ R, M.; SINGH, R. Effect of intravenous and epidural dexmedetomidine on spinal block in lower limb and lower abdominal surgeries. A comparative study. **Int J Sci Res**, v. 6, n. 4, p. 132-135, 2017.

DON, B.R.; KAYSEN, G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. **Semin Dial**, v. 17, n. 6, p. 432-437, 2004.

EGUCHI, N.; MINAMI, T.; SHIRAFUJI, N.; KANAOKA, Y.; TANAKA, T.; NAGATA, A.; YOSHIDA, N.; URADE, Y.; ITO, S.; HAYAISHI, O. Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, n. 2, p. 726-730, 1999.

ENNIS, S. R.; KEEP, R. F. The effects of cerebral ischemia on the rat choroid plexus. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 26, n. 5, p. 675-683, 2006.

FANTA, S.; KINNUNEN, M.; BACKMAN, J. T.; KALSO, E. Population pharmacokinetics of S-ketamine and norketamine in healthy volunteers after intravenous and oral dosing. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 71, n. 4, p. 441-447, 2015.

FEHLINGS, M. G.; NGUYEN, D. H. Immunoglobulin G: a potential treatment to attenuate neuroinflammation following spinal cord injury. **Journal of clinical immunology**, v. 30, n. 1, p. 109-112, 2010.

GALVEZ, S.; FARCAS, A.; MONARI, M. The concentration of alpha-1-antitrypsin in cerebrospinal fluid and serum in a series of 40 intracranial tumors. **Clinica Chimica Acta**, v. 91, n. 2, p. 191-196, 1979.

GANEM, E. M.; VIANNA, P. T. G.; MARQUES, M.; CASTIGLIA, Y. M. M.; VANE, L. A. Efeitos da Administração Subaracnóidea de Grandes Volumes de Lidocaína a 2% e Ropivacaína a 1% sobre a Medula Espinhal e as Meninges. Estudo Experimental em Cães. **Rev Bras Anest**, v. 53, n. 3, p. 351-360, 2003.

GIOVANNITTI Jr, J. A.; THOMS, S. M.; CRAWFORD, J. J. Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications. **Anesth Prog**, v. 62, n. 1, p. 31-38, 2015.

GIZA, C. C.; HOVDA, D. A. The Neurometabolic Cascade of Concussion. **J Athl Train**, v. 36, n. 3, p. 228-235, 2001.

GLANTZ, M. J.; COLE, B. F.; GLANTZ, L. K.; COBB, J.; MILLS, P.; LEKOS, A. WALTERS, B. C.; RECHT, L. D. Cerebrospinal fluid cytology in patients with câncer. **Cancer**, v. 82, n. 4, p. 733-739, 1998.

GOUVEIA, M. A. Fatores que controlam a dispersão das drogas na raquianestesia. In: Imbelloni L.E. (Ed.), **Tratado de Anestesia Raquidiana**. Curitiba, v. 7, p. 67-73, 2001.

GRANT, R.; GRUENBAUM, S. E.; GERRARD, J. Anaesthesia for deep brain stimulation: a review. **Curr Opin Anesthesiol**, v. 28, n. 5, p. 505-510, 2015.

GREENAWAY, J.; PARTLOW, G.; GONSHOLT, N.; FISHER, K. R. S. Anatomy of the lumbosacral spinal cord in rabbits. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 37, n. 1, p. 27-34, 2001.

GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MANCINI, J.; RIENDEAU, D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **J Biol Chem**, v. 279, n. 23, p. 24866-24872, 2004.

GUYTON, A.; HALL, J.E. **Textbook of Medical Physiology**. Elsevier: Philadelphia, 13ed, 2016, 1096 p.

HAMILTON, S. M.; JOHNSTON, S. A.; BROADSTONE, R. V. Evaluation of analgesia provided by the administration of epidural ketamine in dogs with a chemically induced synovitis. **Vet Anaesth Analg**, v. 32, n. 1, p.30-39, 2005.

HAYAISHI, O.; URADE, Y. Prostaglandin D2 in sleep-wake regulation: recente progress and perspectives. **Neuroscientist**, v. 8, n. 1, p. 12-15, 2002.

HOCHWALD, G. M.; SAHAR, A.; SADIK, A. R.; RANSOHOFF, J. Cerebrospinal fluid production and histological observations in animals with experimental obstructive hydrocephalus. **Exp Neurol**, v. 25, n. 2, p. 190-199, 1969.

HODGSON, P. S.; NEAL, J. M.; POLLOCK, J. E.; LIU, S. S. The Neurotoxicity of Drugs Given Intrathecally (Spinal). **Anesth Analg**, v. 88, n. 4, p. 797-809, 1999.

HUANG, T. Y.; CHUNG, H. W.; CHEN, M. Y.; GIIANG, L. H.; CHIN, S. C.; LEE, C. S.; CHEN, C. Y.; LIU, Y J. Supratentorial Cerebrospinal Fluid Production Rate in Healthy Adults: Quantification with Two-dimensional Cine Phase-

Contrast MR Imaging with High Temporal and Spatial Resolution. **Radiology**, v. 233, n. 2, p. 603-608, 2004.

HUANG, Y. C.; LYU, R. K.; TSENG, M. Y.; CHANG, H. S.; HSU, W. C.; KUO, W. C.; CHU, C. C.; WU, Y. R.; RO, L. S.; HUANG, C. C.; CHEN, C. M. Decreased intrathecal synthesis of prostaglandin D2 synthase in the cerebrospinal fluid of patients with acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. **J Neuroimmunol**, v. 206, n. 1-2, p. 100-105, 2009.

JEVTOVIC-TODOROVIC, V. General Anesthetics and Neurotoxicity: How Much Do We Know? **Anesthesiol Clin**, v. 34, n. 3, p. 439-451, 2016.

JOHANSON, C. E.; DUNCAN III, J. A.; KLINGE, P. M.; BRINKER, T.; STOPA E. G.; SILVERBERG, G. D. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. **Cerebrospinal Fluid Res**, v. 5, n. 1, p. 10, 2008.

JOHANSON, C.; STOPA, E.; MCMILLAN, P.; ROTH, D.; FUNK, J.; KRINKE, G. The distributional nexus of choroid plexus to cerebrospinal fluid, ependyma and brain: toxicologic/pathologic phenomena, periventricular destabilization, and lesion spread. **Toxicol Pathol**, v. 39, n. 1, p. 186-212, 2011.

JONES, M. W.; MACCLEAN, M.; PARSONS, C. G.; HEADLEY, P. M. The *in vivo* relevance of the varied channel-blocking properties of uncompetitive NMDA antagonists: tests on spinal neurones. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 1, p. 50-61, 2001.

KANDA, Y.; GOODMAN, D. S.; CANFIELD, R. E.; MORGAN, F. J. The amino acid sequence of human plasma prealbumin. **J Biol Chem**, v. 249, n. 21, p. 6796-6805, 1974.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6ed, San Diego: Academics Press, 2008, 904 p.

KILLER, H. E.; JAGGI, G. P.; FLAMMER, J.; MILLER, N. R.; HUBER, A. R. The optic nerve: a new window into cerebrospinal fluid composition? **Brain**, v. 129, n. 4, p. 1027-1030, 2006.

KLAUMANN, P. R.; KLOSS FILHO, J. C.; NAGASHIMA, J. K. Anestésicos Locais. In: KLAUMANN, P. R.; OTERO, P. E. Anestesia locorregional em pequenos animais. São Paulo: Roca, 2013. p. 23-41.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Rev Bras Reumatol**, v. 46, n.3, p. 199-206, 2006.

KUTHIALA, G.; CHAUDHARY, G. Ropivacaine: A review of its pharmacology and clinical use. **Indian J Anaesth**, v. 55, n. 2, p. 104-110, 2011.

LEE, W. P.; WU, P.Y.; LEE, M. Y.; HO, L. H.; SHIH, W. M. Music listening alleviates anxiety and physiological responses in patients receiving spinal anesthesia. **Complement Ther Med**, v. 31, p.8-13, 2017.

LEE, M. W. L.; MCPHEE, R. W.; STRINGER, M. D. An evidence-based approach to human dermatomes. **Clin Anat**, v. 21, n. 5, p. 363-373, 2008.

LEVINE, J. M.; RUAUX, C. G.; BERGMAN, R. L.; DVM, COATES, J. R.; STEINER, J. M.; WILLIAMS, D. A. Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease. **Am J Vet Res**, v. 67, n. 2, p. 283-287, 2006.

LI, Y.; ZHANGA, B.; WENA, W.; LIUA, S.; HAOA, D.; LIUA, M.; KUANGB, H-X.; HUANG, S-M. The comparison of three methods of drawing cerebrospinal fluid in rabbit. **J Neurosci Methods**, v. 209, n. 2, p. 398-402, 2012.

LIAN, Y. D.; CHEN, Z. X.; ZHU, K. R.; SUN, S. Y.; ZHU, L. P. Efeitos de doses equipotentes de bupivacaína e ropivacaína em modelo de roedor neonatal alimentado com dieta rica em gordura. **Rev Bras Anest**, v. 67, n. 2, p. 131-138, 2017.

LIU, S.; KOPACZ, D. J.; CARPENTER, R. L. Quantitative Assessment of Differential Sensory Nerve Block after Lidocaine Spinal Anesthesia. **Anesthesiology**, v. 82, n. 1, p. 60-63, 1995.

LU, W.; WANG, L.; WO, C.; YAO J. Ketamine attenuates osteoarthritis of the knee via modulation of inflammatory responses in a rabbit model. **Mol Med Rep**, v. 13, n. 6, p. 5013-5020, 2016.

LUNARDI, N.; ORI, C.; ERISIR, A.; JEVTOVIC-TODOROVIC V. General Anesthesia Causes Long-Lasting Disturbances in the Ultrastructural Properties of Developing Synapses in Young Rats. **Neurotox Res**, v. 17, n. 2, p. 179-188, 2010.

LUTZ, N. W.; VIOLA, A.; MALIKOVA, I.; CONFORT-GOUNY, S.; AUDOIN, B.; RANJEVA, J-P.; PELLETIER, J.; COZZONE, P. J. Inflammatory Multiple-Sclerosis Plaques Generate Characteristic Metabolic Profiles in Cerebrospinal Fluid. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, p. e595, 2007.

MAHLEY, R. W.; RALL Jr., S. C. Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 1, n. 1, p. 507-537, 2000.

MAHLEY, R. W.; WEISGRABER, K. H.; HUANG, Y. Apolipoprotein E4: A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 103, n. 15, p. 5644-5651, 2006.

MAKOVER, A.; MORIWAKI, H.; RAMAKRISHNAN, R.; SARAIVA, M. J. M.; BLANER, W. S.; GOODMAN, D. S. Plasma transthyretin. Tissue sites of degradation and turnover in the rat. **J Biol Chem**, v. 263, n. 18, p. 8598-8603, 1988.

MARQUES, F.; SOUSA, J. C.; CORREIA-NEVES, M.; OLIVEIRA, P.; SOUSA, N.; PALHA, J. A. The choroid plexus response to peripheral inflammatory stimulus. **Neuroscience**, v. 144, n. 2, p. 424-430, 2007.

MION G, VILLEVIEILLE T. Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). **CNS Neurosci Ther**, v. 19, n. 6, p. 370-380, 2013.

MUKAI, A. O.; KREBS, V. L. J.; BERTOLI, C. J.; OKAY, T. S. TNF- α and IL-6 in the Diagnosis of Bacterial and Aseptic Meningitis in Children. **Pediatr Neurol**, v. 34, n. 1, p. 25 -29, 2006.

NIEMANTSVERDIET, E.; STRUYFS, H.; DUIT, F.; TEUNISSEN, C. E.; ENGELBORGH, S. Techniques, Contraindications, and Complications of CSF Collection Procedures. In: DEISENHAMMER, F.; SELLEBJERG, F.;

TEUNISSEN, C. E.; TUMANI, H. **Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology**. Springer, Cham, 2015, p. 35-57.

NIGROVIC, L. E.; NATHAN KUPPERMANN, N.; MALLEY, R. Development and Validation of a Multivariable Predictive Model to Distinguish Bacterial From Aseptic Meningitis in Children in the Post-Haemophilus influenzae Era. **Pediatrics**, v. 110, n. 4, p. 712-719, 2002.

NIKIZAD, H.; YON, J. H.; CARTER, L. B.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V. Early exposure to general anesthesia causes significant neuronal deletion in the developing rat brain. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1122, n. 1, p. 69-82, 2007.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. The antiinflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. **J Exp Med**, v. 204, n. 1, p. 11-15, 2007.

NOUR, E. M.; OTHMAN, M. M.; KARROUF, G. I. A.; ZAGHLOUL, A. E. I. Comparative evaluation of the epidural dexmedetomidine, ketamine or fentanyl in combination with bupivacaine in dogs. **Am J Anim Vet Sci**, v. 8, n. 4, p. 230-238, 2013.

OLBRICH, V. H.; MOSING, M. A comparison of the analgesic effects of caudal epidural methadone and lidocaine in the horse. **Vet Anaesth Analg**, v. 30, n. 3, p. 156-164, 2003.

OPPELT, W. W.; PATLAK, C. S.; RALL, D. P. Effect of certain drugs on cerebrospinal fluid production in the dog. **Am J Physiol**, v. 206, n. 2, p. 247-250, 1964.

ORTH, M.; BELLOSTA, S. Cholesterol: its regulation and role in central nervous system disorders. **Cholesterol**, v. 2012, 2012. Acesso em 07 de fevereiro de 2019: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/292598>

OSOFKY, A.; LECOUTEUR, R. A.; VERNAU, K. M. Functional Neuroanatomy of the Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Vet Clin Exot Anim**, v. 10, n. 3, p. 713-730, 2007.

OTERO, A. R. S.; BARBOSA, V. F.; CARNEIRO, R. L.; MARTINS FILHO, E. F.; AZEVEDO, M. C.; SANTOS, B. C. P.; GORDILHO FILHO, A. O.; COSTA

NETO, J. M. Avaliação da infusão contínua de dexmedetomidina ou dexmedetomidina-midazolam sobre variáveis cardiorrespiratórias e qualidade da recuperação anestésica, em cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia. **Rev Bras Med Vet**, v. 38, n. 2, p. 168-174, 2016.

OTERO, P. E. Papel dos anestésicos locais na terapêutica da dor. In: OTERO, P. E. **Dor: avaliação e tratamento em pequenos animais**. São Caetano do Sul: Interbook, 2005. p. 168-191.

PALTRINIERI, S. The feline acute phase reaction. **Vet J**, v. 177, n. 1, p. 26-35, 2008.

PANZER, O.; MOITRA, V.; SLADEN, R. N. Pharmacology of sedative-analgesic agents: dexmedetomidine, remifentanyl, ketamine, volatile anesthetics, and the role of peripheral mu antagonists. **Crit Care Clin**, v. 25, n. 4, p. 451-469, 2009.

PARADOWSKI, M.; LOBOS, M.; KUYDOWICZ, J.; KRAKOWIAK, M.; KUBASIEWICZ-UJMA, B. Acute phase proteins in serum and cerebrospinal fluid in the course of bacterial meningitis. **Clinical biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 459-466, 1995.

PARMAR, M.; PATEL, H.; KANTHARIA, B. Intrathecal pethidine as a sole agent for spinal anesthesia and analgesia – a comparison with 5% lignocaine. **Int J Med Sci Public Health**, v. 6, n.2, p. 291-194, 2017.

PELTONIEMI, M. A.; HAGELBERG, N. M.; OLKKOLA, K. T.; SAARI, T. I. Ketamine: a review of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics in anesthesia and pain therapy. **Clin Pharmacokinet**, v. 55, n. 9, p. 1059-1077, 2016.

POLLAY, M.; CURL, F. Secretion of cerebrospinal fluid by the ventricular ependyma of the rabbit. **Am J of Physiol**, v. 213, n. 4, 1967.

RAZ, A.; SHIRATORI, T.; GOODMAN, D. S. Studies on the protein-protein and protein-ligand interactions involved in retinol transport in plasma. **J Biol Chem**, v. 245, n. 8, p. 1903-1912, 1970.

REIBER, H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. **Clin Chim Acta**, v. 310, n. 2, p. 173-186, 2001.

REN, X.; MA, H.; ZUO, Z. Dexmedetomidine postconditioning reduces brain injury after brain hypoxia-ischemia in neonatal rats. **J NeuroImmune Pharmacol**, v. 11, n. 2, p. 238-247, 2016.

RIZZI, S.; CARTER, L. B.; ORI, C.; JEVTOVIC-TODOROVIC, V. Clinical Anesthesia Causes Permanent Damage to the Fetal Guinea Pig Brain. **Brain Pathol**, v. 18, n. 2, p. 198-210, 2008.

SAITO, A.; SINOHARA, H. Rabbit α -1-antiproteinase E: A novel recombinant serpin which does not inhibit proteinases. **Biochemical Journal**, v. 307, n. 2, p. 369-375, 1995.

SANKARARAO, D. V.; BHAIKAVABHATLA, K. V. A comparative study of intrathecal dexmedetomidine and fentanyl as adjuvants to bupivacaine. **J Evid Based Med Healthc**, v. 4, n. 51, p. 3092-3097, 2017.

SAROTTI, D.; RABOZZI, R.; FRANCI, P. Comparison of epidural versus intrathecal anaesthesia in dogs undergoing pelvic limb orthopaedic surgery. **Vet Anaesth Analg**, v. 42, n. 4, p. 405-413, 2015.

SCHWARZMAN, A. L.; GREGORI, L.; VITEK, M. P.; LYUBSKI, S.; STRITTMATTER, W. J.; ENGHILDE, J. J.; BHASIN, R.; SILVERMAN, J.; WEISGRABER, K. H.; COYLE, P. K.; ZAGORSKI, M. G.; TALAFU, J.; EISENBERG, M.; SAUNDERS, A. M.; ROSES, A. D.; GOLDGABER, D. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 18, p. 8368-8372, 1994.

SHORE, B.; SHORE, V. An apolipoprotein preferentially enriched in cholesteryl ester-rich very low density lipoproteins. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 58, n. 1, p. 1-7, 1974.

SILVEIRA, R. C.; PROCIANOY, R. S. Níveis de interleucina-6 e fator de necrose tumoral- α no liquor de recém-nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica. **J Pediatr**, v. 79, n. 4, p. 297-302, 2003.

SINCLAIR, A. J.; VIANT, M. R.; BALL, A. K.; BURDON, M. A.; WALKER, E. A.; PAUL M. STEWART, P. M.; SAAEHA RAUZ, S.; STEPHEN P. YOUNG, S. P. NMR-based metabolomic analysis of cerebrospinal fluid and serum in neurological diseases - a diagnostic tool? **NMR Biomed**, v. 23, n. 2, p. 123-132, 2010.

SOLTÉSZ, S. Spinalanästhesie: doctor consult. **J Wissen für klinik und Praxis**, v. 1, n. 2, p. 137-143, 2010.

SOPRANO, D. R.; HERBERT, J.; SOPRANO, K. J.; SCHON, E. A.; GOODMAN, D. S. Demonstration of transthyretin mRNA in the brain and other extrahepatic tissues in the rat. **J Biol Chem**, v. 260, n. 21, p. 11793-11798, 1985.

SOUSA, M. M.; BERGLUND, L.; SARAIVA, M. J. Transthyretin in high density lipoproteins: association with apolipoprotein A-I. **Journal of lipid research**, v. 41, n. 1, p. 58-65, 2000a.

SOUSA, M. M.; NORDEN, A. G. W.; JACOBSEN, C.; WILLNOW, T. E.; CHRITENSEN, E. I.; THAKKER, R. V.; MOESTRUP, S. K.; SARAIVA, M. J. Evidence for the role of megalin in renal uptake of transthyretin. **J Biol Chem**, v. 275, n. 49, p. 38176-38181, 2000b.

TERLIZZI, R. D.; PLATT, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I – Function and composition. **Vet J**, v. 172, n. 3, p. 422-431, 2006.

VIDAL, R.; BLANCO, I., CASAS, F.; JARDÍ, R.; MIRATVILLES, M.; PACIENTES, C. D. R. Diagnóstico y tratamiento del déficit de alfa-1-antitripsina. **Archivos de Bronconeumología**, v. 42, n. 12, p. 645-659, 2006.

VIEIRA, A. M.; SCHNAIDER, T. B.; BRANDÃO, A. C. A.; PEREIRA, F. A.; COSTA, D. E.; FONSECA, C. E. P. Clonidina e Dexmedetomidina por Via Peridural para Analgesia e Sedação Pós-Operatória de Colecistectomia. **Rev Bras de Anest**, v. 54, n. 4, p. 473-478, 2004.

VRANKEN, J. H.; TROOST, D.; HAAN, P.; PENNING, F. A.; VEGT, M. H. V.; DIJKGRAAF, M. G. W.; HOLLMANN, M. W. Severe Toxic Damage to the

Rabbit Spinal Cord after Intrathecal Administration of Preservative-free S(+)-Ketamine. **Anesthesiology**, v.105, n. 4, p. 813-818, 2006.

WAGNER II, L. E.; GINGRICH, K. J.; KULLI, J. C.; YANG, J. Ketamine Blockade of Voltage-gated Sodium Channels - Evidence for a Shared Receptor Site with Local Anesthetics. **Anesthesiology**, v. 95, n. 6, p. 1406-1413, 2001.

WANG, Y.; HAN, R.; ZUO, Z. Dexmedetomidine post-treatment induces neuroprotection via activation of extracellular signal-regulated kinase in rats with subarachnoid haemorrhage. **Br J Anaesth**, v. 116, n. 3, p. 384–92, 2016.

WANGPING, Z.; MING, R. Optimal dose of epidural dexmedetomidine added to ropivacaine for epidural labor analgesia: A pilot study. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2017, 2017. Acesso em 20 de janeiro de 2019: <https://doi.org/10.1155/2017/7924148>

WARD, J. L.; HARTING, M. T.; COX Jr, C. S.; MERCER, D. W. Effects of Ketamine on Endotoxin and Traumatic Brain Injury Induced Cytokine Production in the Rat. **J Trauma**, v. 70, n. 6, p. 1471-1479, 2011.

WEAVER, C.; MCMILLAN, P.; DUNCAN, J. A.; STOPA, E.; JOHANSON, C. Hydrocephalus disorders: their biophysical and neuroendocrine impact on the choroid plexus epithelium. **Adv Mol Cell Biol**, v. 31, p. 269-93, 2004.

WHITE, P. F.; KEHLET, H. Improving postoperative pain management: what are the unresolved issues? **Anesthesiology**, v. 112, n. 1, p. 220-225, 2010.

WOLFF, A. P.; GROEN, G. J.; CRUL, B. J. P. Diagnostic Lumbosacral Segmental Nerve Blocks With Local Anesthetics: A Prospective Double-Blind Study on the Variability and Interpretation of Segmental Effects. **Reg Anesth Pain Med**, v. 26, n. 2, p. 147-155, 2001.

5. CAPÍTULO I: Estudo da neurotoxicidade da raquianestesia com ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina em *Oryctolagus cuniculus*

Ferreira-Ermita, et al.

Manuscrito redigido conforme as normas do periódico ao qual foi submetido.

Estudo da neurotoxicidade da raquianestesia com ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina em *Oryctolagus cuniculus*

[Neurotoxicity study of spinal anesthesia with ropivacaine, ketamine and dexmedetomidine in *Oryctolagus cuniculus*]

Ferreira-Ermita, et al.

Resumo

Antecedentes: Terapias aplicadas diretamente na medula espinhal têm potencial de interromper vias de dor específicas, limitando efeitos colaterais sistêmicos, todavia também trazem risco inerente de lesões ao sistema nervoso central (SNC). Com objetivo de estabelecer um protocolo de analgesia, clinicamente seguro, este trabalho analisa possíveis efeitos neurotóxicos da administração raquidiana da associação entre ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina em coelhos, por meio da análise laboratorial do líquido cefalorraquidiano (LCR) e da avaliação histopatológica da medula espinhal.

Métodos: Vinte coelhos Nova Zelândia foram divididos em cinco grupos que receberam pela via subaracnóideia solução fisiológica (GC), ropivacaína (GR), cetamina (GCe), dexmedetomidina (GD) ou a associação entre ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina (GRCeD). O LCR foi coletado antes e três dias após a raquianestesia para análise bioquímica, proteômica e dosagem de interleucina 10 (IL10). Para identificação das proteínas do LCR, utilizou-se aquisição da espectrometria de massa por MALDI TOF/TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight). A dosagem de IL10 foi executada pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Após três dias os coelhos foram submetidos à eutanásia e a medula espinhal foi colhida para análise histopatológica.

Resultados: Observou-se redução na concentração líquórica de glicose ($p=0,046$) e AST ($p=0,028$) no GR. Onze proteínas com pesos moleculares variando de 14 a 96 kDa foram identificadas no LCR na análise proteômica, e não ocorreram alterações significativas destas proteínas após a raquianestesia. A concentração de IL10 no LCR dos coelhos do GRCeD

aumentou após o bloqueio ($p=0,038$). A avaliação histopatológica revelou um aspecto normal da medula espinhal em todos os coelhos, exceto em um animal do GCe, no qual foram observadas cromatólise e neuroniofagia.

Conclusões: A utilização da associação entre a ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina pela via subaracnóidea mostrou-se segura não causando danos ao SNC. Com base nos resultados obtidos nas análises do LCR e na avaliação histopatológica da medula espinhal, este protocolo não produz efeitos neurotóxicos e possivelmente pode contribuir com efeitos neuroprotetores. Assim, esta associação tem sua utilização justificada não apenas pelos benefícios analgésicos que estes fármacos podem proporcionar conforme já bem estabelecido na literatura, mas também, pela segurança na sua aplicabilidade.

Introdução

Para alcançar analgesia e hipnose, em diversos tipos de intervenções cirúrgicas, inúmeros fármacos têm sido testados no sistema nervoso central (SNC), isoladamente ou em combinações, com o objetivo de interromper a comunicação neuronal [1]. A raquianestesia é a técnica na qual se executa a deposição de um agente anestésico no espaço subaracnoideo, em contato com o líquido cefalorraquidiano (LCR) [2]. Possíveis lesões neurológicas persistentes decorrentes desta técnica, apesar de incomuns, são motivos de grande preocupação e foco de discussões e pesquisas [3-6].

A toxicidade à medula espinhal após a exposição a um medicamento pode manifestar-se como distúrbios histológicos, fisiológicos e/ou comportamentais [3,5,6], e, em casos de lesões ao SNC, é possível detectar alterações que indicam o envolvimento da cascata inflamatória por meio da expressão de moléculas de adesão específicas, fatores quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias no LCR [7].

Nos últimos anos a ropivacaína tem ganhado espaço dentro do hall de fármacos utilizados na raquianestesia, porque produz menor bloqueio motor [8] e apresenta segurança satisfatória quando depositada no espaço subaracnoideo [9]. Por isso, tem sido utilizada em associação à fármacos de outras classes, com o intuito de melhorar a analgesia [10-12], como por exemplo a cetamina [13] e a dexmedetomidina [11].

A combinação da cetamina à ropivacaína reduz ainda mais a condução nociceptiva melhorando a qualidade analgésica, por prevenir estados de hiperexcitabilidade no SNC, mediante antagonismo aos receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) [13]. A dexmedetomidina, um potente agonista α -2 adrenérgico, altamente seletivo, com propriedades simpatolíticas, sedativas, amnésicas e analgésicas [14], mostrou potencialização sob os efeitos dos anestésicos locais quando administrada por via peridural [15], também tem efeito analgésico tal que permite que ela seja descrita como um poupador de opioides [16].

Com o objetivo de estabelecer um protocolo de analgesia, clinicamente seguro, este trabalho analisa possíveis efeitos neurotóxicos da administração raquidiana da associação entre a ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina

em coelhos, por meio da análise bioquímica, proteômica e dosagem de IL10 no LCR e da investigação histopatológica da medula espinhal.

Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da instituição de origem sob o protocolo 37/2018, estando de acordo com a legislação brasileira vigente.

Vinte coelhos da raça Nova Zelândia, sadios, adultos, com peso médio de 3 Kg, foram divididos randomicamente em cinco grupos experimentais, com quatro animais, de acordo com o fármaco utilizado para a raquianestesia.

Os reflexos sensoriais e motores foram previamente avaliados para que alterações permanentes, consequentes do protocolo pudessem ser observadas. Ato contínuo, fora realizada a indução anestésica com isoflurano¹ 2%, diluído em oxigênio 100% em fluxo de 3 l/min, em circuito aberto, com auxílio de máscara, sob respiração espontânea, até a perda do reflexo palpebral. Posteriormente, a veia auricular lateral foi puncionada com cateter calibre 24G para administração da fluidoterapia com solução de cloreto de sódio 0,9% na taxa de 10 ml/kg/h. O plano anestésico foi mantido com a administração de isoflurano dose efeito, em oxigênio 100%.

Os coelhos foram posicionados em decúbito lateral direito, com a cabeça tracionada ventralmente, e após a tricotomia e antisepsia com solução alcoólica de clorexidina (0,5%), a região cervical foi isolada com pano de campo fenestrado estéril. Em seguida aproximadamente 1,5 ml de LCR foi colhido por meio da abordagem atlanto-occipital, por gotejamento, utilizando agulha hipodérmica calibre 22G (Fig. 1) com bisel da agulha direcionado cefalicamente, período denominado tempo zero (T0). Neste mesmo período, coletou-se sangue, por meio da punção da veia jugular, para que os valores observados na bioquímica líquórica pudessem ser confrontados com àqueles obtidos na bioquímica do soro (dados não demonstrados), e assim, determinar quando as variações eram de origem local ou sistêmica.

¹ Isoflurano, solução para inalação – Instituto Biochimico Indústria Farmacêutica Ltda.

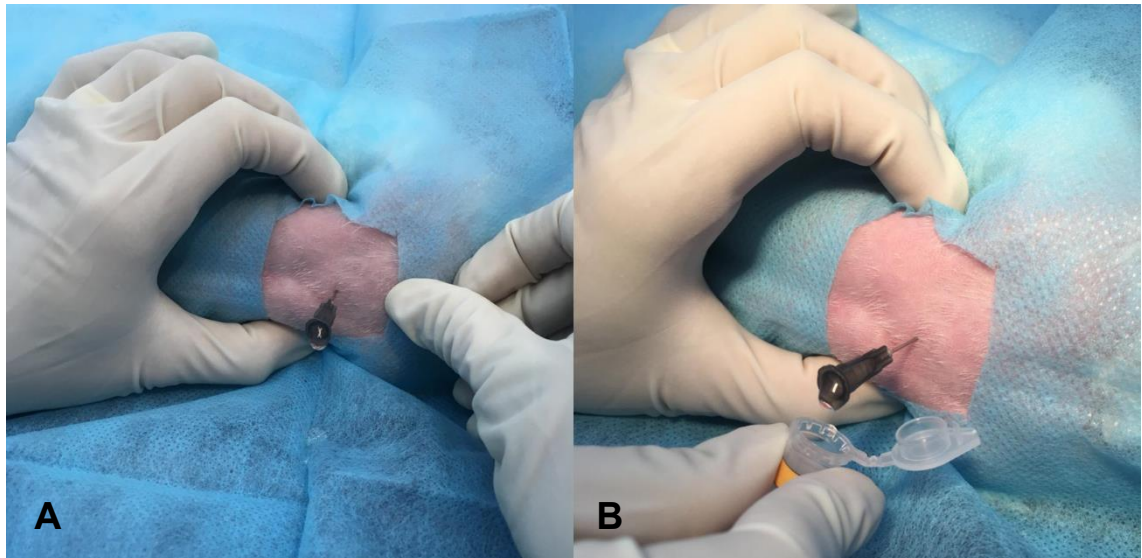


Figura 1: Punção atlanto-occipital em coelho para a obtenção de LCR. **(A)** Inserção de uma agulha hipodérmica, calibre 22G, após localização, por palpação, da protuberância occipital (dedo polegar à direita) e das asas do atlas (dedos polegar e indicador à esquerda), formando um triângulo equidistante entre estes três pontos como referência para o correto posicionamento da agulha; **(B)** coleta de LCR pelo método de gotejamento após punção atlanto-occipital.

Cada amostra de LCR foi dividida em três alíquotas de aproximadamente 0,5 ml. A primeira foi encaminhada, imediatamente após a colheita, para as avaliações bioquímicas. As outras duas foram congeladas a -80°C para posterior análise proteômica e dosagem de IL10.

Considerou-se falha no procedimento de coleta todas as vezes que as amostras de LCR foram contaminadas com sangue ou quando a quantidade não era suficiente para as análises laboratoriais pretendidas.

Após a colheita do LCR, foi executada a raquianestesia utilizando-se o espaço entre as vértebras lombares L5 e L6, repetindo-se os cuidados de tricotomia e antissepsia tomados para a colheita do LCR. Para tal, os coelhos foram posicionados em decúbito esternal com os membros pélvicos tracionados cranialmente. O bloqueio foi realizado utilizando a abordagem paramediana, e a localização do espaço L5-L6 foi realizada após determinação do espaço lombossacro seguida de palpação retrógrada dos processos espinhosos até a região alvo. Assim, uma agulha hipodérmica calibre 24G foi introduzida até que o LCR fluísse espontaneamente. Em

seguida, a raquianestesia foi administrada utilizando o fármaco correspondente ao grupo selecionado (Tab. 1).

Tabela 1: Divisão dos grupos experimentais e dosagem de ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina para administração subaracnoidea em cada grupo estudado

Grupos	Fármaco utilizado na raquianestesia	n	Dosagem
GC	Solução de cloreto de sódio 0,9%	4	VTC para GRCeD
GR	Ropivacaína ²	4	2 mg/kg
GCe	Cetamina ³	4	2 mg/kg
GD	Dexmedetomidina ⁴	4	2 µg/kg
GRCeD	Ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina	4	2 mg/kg + 2 mg/kg + 2 µg/kg

GC: grupo controle; GR: grupo ropivacaína; GCe: grupo cetamina; GD: grupo dexmedetomidina; GRCeD: grupo ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina; n: número de animais; VTC: volume total calculado.

O volume administrado nos grupos GC, GR, GD e GCe foram todos ajustados com solução salina 0,9% em função do volume calculado para o GRCeD, de maneira que fosse depositado no espaço subaracnoideo um volume total equivalente a 0,31 ml/kg em todos os animais. Ao término da infiltração o fornecimento de isoflurano foi interrompido.

Decorridos três dias da administração da raquianestesia, os animais foram novamente anestesiados, seguindo o mesmo protocolo de indução descrito anteriormente, para colheita de LCR e sangue. Este período foi denominado tempo um (T1). Em seguida, o plano anestésico foi aprofundado aumentando-se a dose de isoflurano somada à administração de 5 µg/kg de cloridrato de fentanila⁴ por via endovenosa (EV), e os animais foram submetidos à eutanásia por meio da infusão EV de propofol⁵ (10 mg/kg) seguida da administração em sobredose de cloreto de potássio.

Após eutanásia, a coluna vertebral de cada animal foi removida cirurgicamente a partir de L3 até S4, para processamento e análise histológica da medula espinhal. Os seguimentos vértebra-medula foram colhidos em até 3 minutos após o procedimento de eutanásia e imediatamente fixados em

² Ropi® - Cloridrato de ropivacaína, solução injetável de 7,5 mg/ml - CRISTÁLIA Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

³ Ketamin® – Cloridrato de dextrocetamina, solução injetável de 50 mg/ml - CRISTÁLIA Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

⁴ Dexdomitor® – Cloridrato de dexmedetomidina, solução injetável de 0,5 mg/ml - ZOETIS Indústria de Produtos Veterinários Ltda.

formalina 10%. Após 24h as vértebras foram serradas para extração da medula espinhal (Fig. 2), e estas foram imersas novamente em formalina 10% por 24h, em seguida foram submetidas ao procedimento histológico de rotina, sendo elaborados cortes transversais de 5 micrômetros de espessura corados por hematoxilina e eosina.



Figura 2: Medula espinhal de coelho, coletada 3 dias após a raquianestesia.

Análise do líquido cefalorraquidiano

Análise bioquímica

Foi realizada análise visual da coloração e do aspecto do LCR, seguida da centrifugação do mesmo por 10 minutos a 1800 rpm. Foram realizadas as dosagens de glicose, lactato, cloreto, aspartato aminotransferase (AST), creatina fosfoquinase e proteína total, no período de até 2h após a coleta.

Análise proteômica

Após descongelamento as amostras de LCR foram submetidas à análise eletroforética pelo método SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Utilizou-se um marcador de peso molecular (Broad Range, Bio-Rad). O SDS-PAGE foi realizado correndo o gel em dois estágios (concentração e separação) a 80 volts por 4h, utilizando o equipamento mini-gel (Mini-PROTEAN Tetra Cell; Bio-Rad). Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) e colocados em solução descorante (metanol 25% v/v, ácido acético 7,5% v/v) conforme protocolo padrão, descrito por Laemmli [17].

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE unidimensional (1D), as bandas mais evidentes foram escolhidas para identificação, sendo excisadas para realização da digestão enzimática, conforme protocolo descrito por Shevchenko et al. [18], seguida da aquisição de espectros de massa (MS) por MALDI TOF/TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight).

As listas de massas obtidas foram confrontadas com o banco de dados de proteínas do táxon *Oryctolagus* depositado no UNIPROT. A busca foi realizada por meio do aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK) e validado estatisticamente pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software INC., Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo *Peptide Prophet* [19] e para as proteínas o algoritmo *Protein Prophet* [20], como critério de aceitação foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90% de probabilidade para a identificação tanto das proteínas quanto dos peptídeos, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

As proteínas identificadas pelo MASCOT e validadas pelo SCAFFOLD, denominadas “Uncharacterized” (“Proteína não caracterizada”) foram analisadas usando o software BLAST, versão 2.4.0 [21]. Nessa análise, foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados *protein non-redundant* (nr) do NCBI apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “Uncharacterized”.

As bandas nos géis foram quantificadas em mg/dl a partir do valor obtido para proteína total na bioquímica líquórica, e os dados obtidos foram comparados antes e após a raquianestesia.

Dosagem de IL10

A dosagem de IL10 nas amostras de LCR foi executada pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizando o kit ELISA IL10 Cloud-Clone Corp™, específico para IL10 de *Oryctolagus cuniculus*.

Antes do teste as amostras foram descongeladas e permaneceram em estufa até atingirem 37°C. Posteriormente foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min para remoção de qualquer resíduo celular, e foram analisadas em duplicata contra a curva padrão apropriada, gerada também em duplicata.

Análise estatística

A normalidade da distribuição dos dados e a homogeneidade das variâncias foram atestadas pelos testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. A avaliação das médias entre os grupos em cada tempo (T0 e T1) se deu por meio da análise de variância de um fator entre grupos (oneway-ANOVA) e as comparações múltiplas entre os grupos pelo teste *post hoc* de Tukey. A comparação das médias entre os tempos T0 e T1, em cada grupo, foi realizada pelo teste *t-Student* para amostras pareadas. Todas as análises foram realizadas no pacote estatístico MINITAB 17.1.0 (Minitab® Inc.) e a significância considerada quando $p < 0,05$.

Resultados

A localização do espaço intervertebral lombar 5 e 6 foi feita de forma fácil e rápida e a técnica de raquianestesia foi executada sem complicações. Por outro lado, a colheita de LCR em coelhos mostrou-se um procedimento desafiador em função do pouco volume disponível mesmo pelo acesso atlanto-occipital, com baixa pressão de vazão, que reduzia ainda mais durante os movimentos inspiratórios. Além disso, por se tratar de uma região muito vascularizada, por vezes o procedimento foi interrompido em função da contaminação do LCR com sangue. Todas as amostras de LCR utilizadas nas análises deste estudo apresentaram-se incolores e límpidas, e amostras eritrocromicas foram descartadas.

A função motora dos coelhos foi temporariamente afetada após a raquianestesia tendo aparente relação com o grupo ao qual pertenceu cada animal, contudo, não ocorreram alterações motoras permanentes em nenhum dos grupos avaliados. Reações neurológicas idiossincráticas transitórias como ataxia, espasmo e mioclonia foram observadas em um animal do grupo controle. A raquianestesia foi repetida três vezes com intervalos de 15 dias neste coelho e, após a observar repetição destas reações indesejáveis, o animal foi excluído do estudo.

Os grupos foram similares em relação à avaliação bioquímica do LCR, entretanto, foi observada redução na mensuração de glicose ($p=0,046$) e AST ($p=0,028$) no GR, permanecendo dentro do padrão fisiológico de normalidade para a espécie. Antes do bloqueio anestésico (T0), os valores obtidos no GR para glicose e ALT no LCR foram respectivamente $76,3\pm 7,3$ mg/dl e $50,3\pm 6,7$ U/l, e três dias após a administração da ropivacaína (T1) estes valores haviam reduzido para $67,3\pm 5,2$ mg/dl e $40,8\pm 2,8$ U/l. Esta variação não foi observada na bioquímica sérica, o que sugere ser uma modificação local, restrita ao SNC, provocada pelo bloqueio realizado com ropivacaína.

O SDS-PAGE 1D permitiu identificar onze proteínas com pesos moleculares variando de 14 a 96 kDa. Destas, nove foram identificadas pelo nome, como se segue: glicoproteína rica em histidina, α -1-antiproteinase F, transtirretina, apolipoproteína E e apolipoproteína E4, albumina, prostaglandina-D-sintase e subunidade β -1/2 da hemoglobina. As proteínas

denominadas “Proteína não caracterizada”, apresentaram 84% de identidade com a Imunoglobulina gamma H-chain (IgG de cadeia pesada) (número de acesso NCBI nr AAA64252). As bandas observadas na eletroforese 1D escolhidas para identificação destas proteínas estão evidenciadas na figura 3 com seus respectivos pesos moleculares em quilodaltons (kDa).

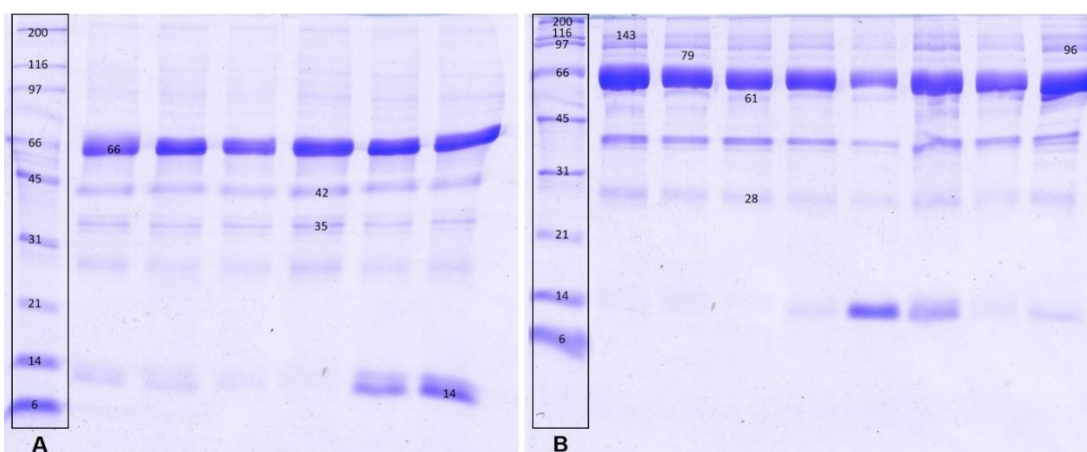


Figura 3: Géis da SDS-PAGE 1D. **(A)** e **(B)** bandas excisadas para digestão trípica identificadas pelo peso molecular em kDa; marcador de peso molecular em destaque (retângulo).

Os resultados obtidos pelo MALDI TOF/TOF com identificação pelo MASCOT das proteínas presentes estão expressos na tabela 2.

Tabela 2: Relação das proteínas identificadas nas bandas analisadas por meio do MALDI TOF/TOF

Banda (kDa)	Proteína	Nº de acesso	Probabilidade	Peptídeos
96	Glicoproteína rica em histidina	G1U754	95%	GEVLPPEANFPSFLR
	Proteína não caracterizada	G1THZ6	95%	VVSTLPIAHQDWLR
79	Proteína não caracterizada	G1THZ6	99%	VVSTLPIAHQDWLR
66	Albumina	P49065	100%	AFFGHLYEVAR
				RHPYFYAPPELLYYAQK
				KVPQVSTPTLVEISR
				LPCVEDYLSVVLNR
61	α-1-antiproteínase F	P23035	95%	IAPSLAEFALSLYR
42	Apolipoproteína E	P18287	100%	AGQPWELALGR
	Trastirretina	G1TDI4	90%	ALGISPFHEYAEVFTANDSGHR
33	Apolipoproteína E	P18287	100%	AGQPWELALGR
				LQAEAFQAR

	Apolipoproteína E4	D5G340	98%	LGPLLEQGR
28	Prostaglandina D sintase	Q9N2C2	95%	AQGFTEDIVVFLPR
14	Subunidade β da hemoglobina	P02057	100%	VNVEEVGGEALGR

A tabela 3 apresenta os valores calculados para as bandas, em mg/dl. Não ocorreram alterações significativas destes valores entre grupos ou entre os tempos T0 e T1.

Tabela 3: Níveis proteicos expressos em mg/dl, antes e após raquianestesia nos grupos estudados

Bandas (mg/dl)	GRUPO				
	GC	GR	GCe	GD	GRCeD
96 kDa					
T0	17,3±14,2	12,93±6,3	15,4±10,4	25,6±18,7	15,1±6,4
T1	18,0±14,7	19,3±11,5	24,2±2,7	30,6±11,5	18,2±11,4
79 kDa					
T0	10,0±9,4	6,3±4,8	6,8±7,4	6,4±5,8	6,6±2,3
T1	11,9±13,0	7,4±7,2	7,6±5,4	7,7±5,6	8,8±4,9
66 kDa					
T0	153,0±28,8	140,4±25,5	163,2±74,1	156,0±30,9	155,4±43,9
T1	184,9±18,5	175,9±55,8	176,5±23,5	206,2±63,8	173,3±34,1
61 kDa					
T0	7,9±7,2	24,3±11,4	16,8±15,35	15,2±10,8	7,9±5,6
T1	15,9±7,5	24,6±14,3	17,7±15,5	16,9±11,4	18,1±16,7
42 kDa					
T0	31,9±19,3	25,3±1,8	31,1±14,5	36,2±3,8	31,7±7,1
T1	29,1±3,8	34,6±6,2	35,9±8,8	29,7±5,2	34,8±6,9
33 kDa					
T0	12,0±4,7	13,7±3,8	13,3±9,4	19,0±3,3	12,4±3,8
T1	15,6±8,4	17,3±7,4	14,6±2,9	14,7±1,2	13,3±4,9
28 kDa					
T0	24,3±11,9	18,1±7,7	18,3±7,8	21,3±11,9	16,0±3,0
T1	26,5±11,8	23,3±12,3	19,1±9,5	21,3±10,5	19,1±5,9
14 kDa					
T0	55,0±69,1	42,5±54,5	42,4±56,6	18,1±14,3	13,7±14,1
T1	22,5±12,5	70,0±57,6	109,0±85,0	47,2±47,5	40,7±49,3

GC: grupo controle; GR: grupo ropivacaína; GCe: grupo cetamina; GD: grupo dexmedetomidina; GRCeD: grupo ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina; T0: tempo zero, T1: tempo 1.

Houve aumento significativo na concentração de IL10 no LCR dos coelhos do grupo GRCeD após a raquianestesia ($p=0,038$) e, embora os demais grupos não tenham demonstrado diferença estatística entre o T0 e o T1, é possível observar a oscilação nos valores desta citocina entre os tempos (Figura 4) e esta consideração pode ser fisiologicamente importante.

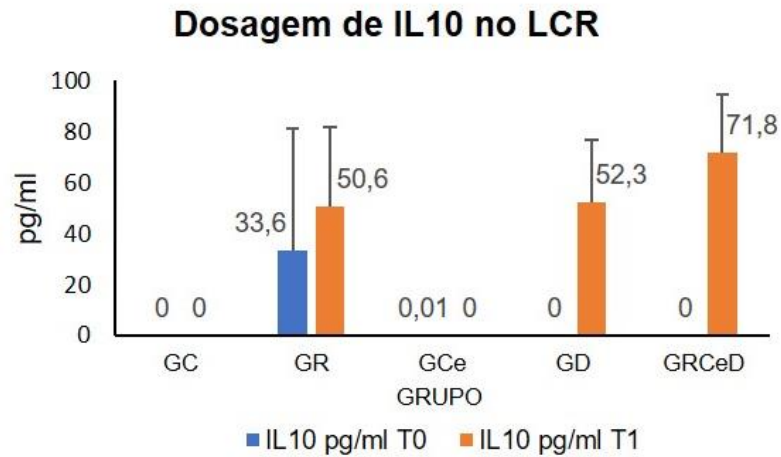


Figura 4: Representação gráfica da mensuração de IL 10 (pg/ml) no LCR antes e após a raquianestesia (valores médios por grupo).

Três dias após a raquianestesia, os achados histopatológicos foram compatíveis com a histologia de uma medula espinhal normal. Observou-se em apenas um coelho, do GCe, a ocorrência de cromatólise total e neuroniofagia de alguns neurônios motores entre L6 e L7 (Fig. 5). Não foram constatadas alterações sugestivas de neurotoxicidade nas substâncias branca ou cinzenta, tampouco fora evidenciada infiltração por células inflamatórias no espaço subaracnoideo em nenhum dos demais animais estudados. Ademais, as alterações observadas no animal relatado não tiveram relação com quaisquer alterações clínicas evidentes.

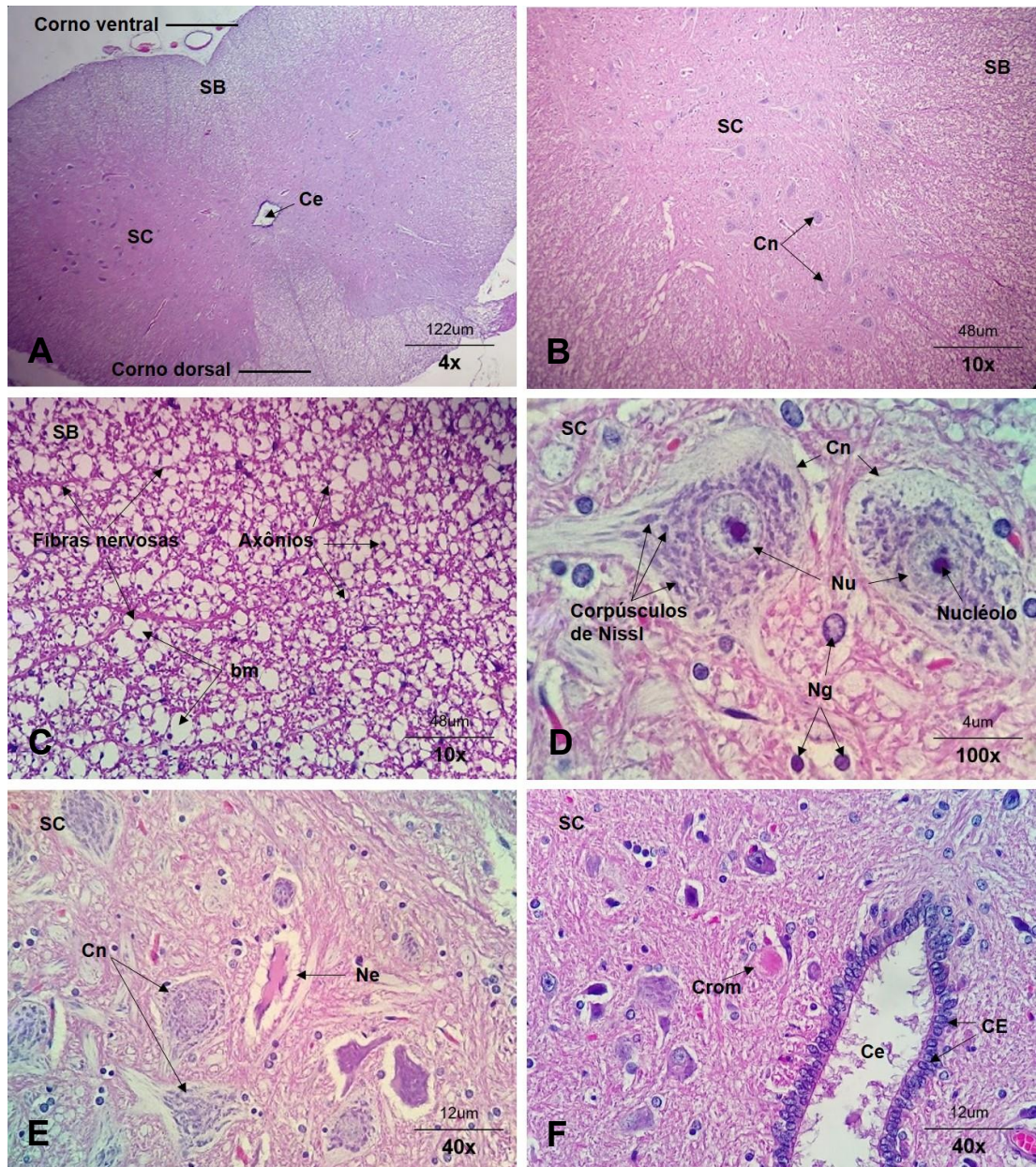


Figura 5: Fotomicrografias de cortes transversais das medulas espinhais de coelho três dias após a raquianestesia, corados por hematoxilina e eosina. Medula espinhal com aspecto histológico de normalidade em coelhos dos grupos **(A)** controle (GC), **(B)** ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina (GRCeD), **(C)** ropivacaína (GR) e **(D)** dexmedetomidina (GD); e ocorrência de **(E)** neuroniofagia (Ne) e **(F)** cromatólise total (Crom) observadas no o espaço intervertebral L6 e L7 em apenas um animal do grupo cetamina (GCe).

SB: substância branca, SC: substância cinzenta, Ce: canal epidimário, Cn: corpo de neurônio, bm: região negativa correspondente à bainha de mielina, Nu: núcleo de neurônio, Ng: núcleos de células da glia e CE: células epidimárias.

Discussão

É importante compreender que a interpretação dos resultados laboratoriais requer uma correlação cuidadosa com a avaliação física dos animais, uma vez que processos inflamatórios acarretam alterações que podem ser observadas na avaliação clínica. O fato de nenhum animal estudado ter apresentado alterações motoras e sensoriais permanentes já é um indício de segurança na utilização da ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina pela via subaracnoidea. Vale ressaltar que, reações adversas à técnica podem ser decorrentes de fatores intrínsecos não relacionados aos fármacos, como observado em um animal do grupo controle.

A redução dos níveis de glicose no LCR, observada nos animais do GR, ocorreu possivelmente pelo gasto energético durante o transporte de glutamato para o meio intracelular. Este estudo não realizou a quantificação de glutamato, entretanto, sabe-se que os anestésicos locais podem aumentar os níveis deste aminoácido no LCR por mecanismos ainda não identificados [4]. É possível que o bloqueio de canais de sódio (Na^+), principal mecanismo de ação dos anestésicos locais, como a ropivacaína [22], tenha promovido o aumento de glutamato, uma vez que a concentração extracelular de glutamato após sua liberação sináptica é altamente regulada por transportadores de alta afinidade dependentes de Na^+ localizados tanto em neurônios quanto em astrócitos [23]. Como o glutamato não é degradado no meio extracelular [24] e a atividade de seus transportadores depende do gradiente eletroquímico gerado pelo Na^+ nas membrana celular, quando ocorre qualquer interrupção nesta via de captação do glutamato, outras vias, ATP-dependentes são requisitadas [25], o que pode resultar em aumento no consumo da glicose para a produção de ATP.

De acordo com McKenna et al. [24], a AST está diretamente relacionada ao metabolismo do glutamato que sofre transaminação via AST, e o α -cetoglutarato resultante é metabolizado via ciclo dos ácidos tricarboxílicos, formando oxaloacetato utilizado como substrato da AST para produção de aspartato. Com a redução do glutamato disponível dentro da célula, por inibição dos seus principais receptores de transporte, a atividade da AST pode apresentar-se reduzida por déficit das estruturas carbônicas

provenientes do glutamato. Aventa-se complementarmente que, a influência da ropivacaína na bioquímica líquórica no GRCeD pode ter sido compensada pela ação da dexmedetomidina que, de acordo com Chiu et al. [14], atua nos adrenoreceptores α 2A suprimindo canais de cálcio inibindo a liberação de glutamato e por isso, as mesmas modificações bioquímicas não foram identificadas neste grupo.

Pode-se presumir, considerando aspectos fisiológicos, que as mudanças encontradas na bioquímica líquórica estão dentro da normalidade e reafirmam a segurança do protocolo. Corroborando estes resultados, a manutenção dos valores referentes às proteínas dosadas no LCR por SDS-PAGE 1D, em especial a albumina, glicoproteína rica em histidina, prostaglandina D sintase, apolipoproteína E e E4 e α -1-antiproteínase F, que podem estar envolvidas na sinalização inflamatória, aumenta a confiabilidade no protocolo estudado, sugerindo que nem os fármacos utilizados para os bloqueios, nem a introdução da agulha e tampouco o volume de administração foram capazes de promover estímulo suficiente para desencadear um processo inflamatório evidente ou predispor danos ao SNC. De acordo com Terlizze et al. [26] e Khoonsari et al. [27] a análise do LCR é de grande sensibilidade para detectar danos neurológicos. Na última década, o interesse pelo estudo da proteômica no LCR tem crescido. Apesar disso, há poucos dados disponíveis acerca da composição proteica do LCR, principalmente porque as proteínas estão em número relativamente elevado, porém em quantidades muito pequenas e em concentrações que oscilam sob uma grande faixa dinâmica, mesmo em condições fisiológicas, o que estabelece valores de referência muito amplos e dificulta a interpretação dos resultados, sendo de grande preocupação analítica quando se estuda a proteômica.

Em animais de experimentação, como coelhos, utilizados neste estudo, as dificuldades são suplementarmente determinadas pelo pouco volume de LCR disponível para análise. Ademais, os estudos desenvolvidos nesta linha de pesquisa geralmente abordam doenças neurodegenerativas e neoplasias. Existem poucos, ou nenhum estudo anterior avaliando a proteômica no LCR em espécies anestesiadas.

De forma prática, é mais conveniente determinar as concentrações de proteínas de fase aguda (PFA) do que determinar as concentrações de

citocinas, responsáveis pelos níveis aumentados de PFAs [28]. As funções centrais da IL-10 convergem na proteção de órgãos e tecidos contra danos causados por infecções e por respostas inflamatórias [29], assim, seu aumento normalmente está relacionado ao aumento prévio de citocinas pró-inflamatórias. Porém, há várias limitações neste estudo para a determinação do verdadeiro motivo pelo qual ocorreu aumento na expressão de IL10. Como não foram mensuradas as citocinas pró-inflamatórias, poder-se-á arguir se este achado foi decorrente ou não do aumento paralelo de IL6, TNF- α ou outras citocinas pró-inflamatórias após a raquianestesia. Por outro lado, vale ressaltar que por ter sido observada elevação mais acentuada na mensuração de IL10 no GRCeD em comparação aos outros grupos, é possível sugerir que a associação destes fármacos possa, de forma mais evidente, ter contribuído para o aumento na expressão da IL10, sendo um protocolo que, além de não ter causado danos evidentes conforme análise bioquímica e proteômica, pode contribuir com efeitos anti-inflamatórios. Embora os grupos GR e GD não tenham demonstrado aumento estatisticamente significativo, foi possível observar que ocorreram oscilações na concentração de IL10 nestes grupos, tendendo ao aumento no T1, apontando que a associação da ropivacaína e da dexmedetomidina pode ter sido responsável pela potencialização deste efeito no GRCeD.

O grupo GCe foi o único, excetuando-se o grupo controle, a não expressar aumento nesta citocina. A utilização de cetamina subaracnóidea foi relacionada anteriormente a efeitos neurotóxicos [5], porém os estudos sobre este fármaco por esta via, ainda são muito controversos [30] e os mecanismos neurotóxicos pouco explicados. Considerando os efeitos neuroprotetores da IL10, já relatados na literatura [29], e traçando um paralelo de que o GCe, sendo o único grupo a não expressar elevação desta citocina, foi também o único a apresentar alterações histopatológicas compatíveis com neurotoxicidade, sugere-se que há uma relação direta entre a elevação de IL10 e a segurança na utilização do protocolo de associação sugerido neste estudo. É importante ponderar também que a alteração histopatológica não foi o padrão para o GCe, sendo uma ocorrência que pode estar intrinsecamente relacionada ao animal estudado e não ao potencial de neurotoxicidade da cetamina, uma vez que ela também já foi reportada na

literatura por seus efeitos anti-inflamatórios sistêmicos como relatado por Bell e Kalso [30].

Em síntese, a utilização da associação entre a ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina pela via subaracnóidea mostrou-se segura não causando danos ao SNC. Com base nos resultados obtidos nas análises do LCR e na avaliação histopatológica da medula espinhal, este protocolo não desencadeou efeitos neurotóxicos e possivelmente pode contribuir com efeitos neuroprotetores. Assim, esta associação tem sua utilização justificada não apenas pelos benefícios analgésicos que estes fármacos podem proporcionar conforme já estabelecido na literatura, mas também, pela segurança na sua aplicabilidade.

Referências

1. [Jevtovic-Todorovic V](#): General Anesthetics and Neurotoxicity: How Much Do We Know? *Anesthesiol Clin* 2016; 34:439-51
2. Soltész S: Spinalanästhesie: doctor consult. *J. Wissen für klinik und Praxis* 2010; 1:137-43
3. Ganem EM, Vianna PTG, Marques M, Castiglia YMM, Vane LA: Efeitos da Administração Subaracnóidea de Grandes Volumes de Lidocaína a 2% e Ropivacaína a 1% sobre a Medula Espinhal e as Meninges. Estudo Experimental em Cães. *Rev Bras Anesthesiol* 2003; 53:351-60
4. Yamashita A, Matsumoto M, Matsumoto S, Itoh M, Kawai K, Sakabe T: A Comparison of the Neurotoxic Effects on the Spinal Cord of Tetracaine, Lidocaine, Bupivacaine, and Ropivacaine Administered Intrathecally in Rabbits. *Anesth Analg* 2003; 97:512–9
5. Vranken JH, Troost D, Haan P, Pennings FA, Van der Vegt MH, Dijkgraaf MG W, Hollmann MW: Severe Toxic Damage to the Rabbit Spinal Cord after Intrathecal Administration of Preservative-free S(+)-Ketamine. *Anesthesiology* 2006; 105:813–8
6. Lian YD, Chen Z, Zhu KR, Sun SY, Zhu LP: Efeito de doses equipotentes de bupivacaína e ropivacaína em modelo de roedor neonatal alimentado com dieta rica em gordura. *Rev Bras Anesthesiol* 2017; 67:131-8
7. Silveira RC, Procianoy RS: Níveis de interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa no liquor de recém-nascidos a termo com encefalopatia hipóxico-isquêmica. *J Pediatr* 2003; 79:297-302
8. Wangping Z, Ming R: Optimal dose of epidural dexmedetomidine added to ropivacaine for epidural labor analgesia: A pilot study. *Evid Based Complement Alternat Med*, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7924148> Acesso em 20 de janeiro de 2019.
9. Cantürk M, Kilci O, Ornek D, Ozdogan L, Pala Y, Sen O, Dikmen B: Ropivacaína para Raquianestesia Unilateral: Hiperbárica ou Hipobárica? *Rev Bras Anesthesiol* 2012; 62:298-311
10. Quian XW, Chen XZ, Li DB: Low-dose ropivacaine-sufentanil spinal anaesthesia for caesarean delivery: a randomised trial. *Int J Obstet Anesth* 2009; 17:309-14

11. Brummett CM, Hong EK, Janda AM, Amodeo FS, Lydic R: Perineural Dexmedetomidine Added to Ropivacaine for Sciatic Nerve Block in Rats Prolongs the Duration of Analgesia by Blocking the Hyperpolarization-activated Cation Current. *Anesthesiology* 2011; 115:836-43
12. Kumar A, Bhat WM, Gurcoo SA, Rehman A: Comparative evaluation of clonidine and fentanyl as adjuvants to intrathecal isobaric ropivacaine for lower limb surgeries - a randomised, double blind prospective study. *Int J Sci Res* 2017; 6:30-32
13. Jones MW, Maclean M, Parsons CG, [Headley PM](#): The *in vivo* relevance of the varied channel-blocking properties of uncompetitive NMDA antagonists: tests on spinal neurones. *Neuropharmacology* 2001; 41:50-61
14. Chiu KM, Lin TY, Lu CW, Wang SJ: Inhibitory effect of glutamate release from rat cerebrocortical nerve terminals by α_2 adrenoceptor agonist dexmedetomidine. *Eur J Clin Pharmacol* 2011; 670:137-47
15. Vieira AM, Schnaider TB, Brandão A A, Pereira FA, Costa DE, Fonseca CEP: Clonidina e Dexmedetomidina por Via Peridural para Analgesia e Sedação Pós-Operatória de Colectomia. *Rev Bras Anestesiol* 2004; 54:473-8
16. Panzer O, Moitra V, Sladen RN: Pharmacology of sedative-analgesic agents: dexmedetomidine, remifentanyl, ketamine, volatile anesthetics, and the role of peripheral mu antagonists. *Crit Care Clin* 2009; 25:451-69
17. Laemmli UK: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5
18. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M: In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 2006; 1:2856-60
19. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R: Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem* 2002; 74:5383-92
20. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R: A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2003; 75:4646-58
21. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215:403-10

22. Kuthiala G, Chaudhary G: Ropivacaine: A review of its pharmacology and clinical use. *Indian J Anaesth* 2011; 55:104-10
23. Valli LG, Sobrinho JA: Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. *Rev Bras Neuro Psiq* 2014; 18:58-67
24. McKenna MC, Stridh MH, McNair LF, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A: Glutamate Oxidation in Astrocytes: Roles of Glutamate Dehydrogenase and Aminotransferases. *J Neurosci Res* 2016; 94:1561-71
25. Camacho A, Massieu L: Role of Glutamate Transporters in the Clearance and Release of Glutamate during Ischemia and its Relation to Neuronal Death. *Arch Med Res* 2006; 37:11-8
26. Terlizzi RD, Platt S: The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I – Function and composition. *Vet J* 2006; 172:422-31
27. Khoonsari PE, Häggmark A, Lönnberg M, Mikus M, Kilander L, Lannfelt L, Bergquist J, Ingelsson M, Nilsson P, Kultima K, Shevchenko G: Analysis of the Cerebrospinal Fluid Proteome in Alzheimer's Disease. *PLoS One* 2016; 11: e0150672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150672> Acesso em 10 de fevereiro de 2019
28. Freitas FLC, Yamamoto BL, Freitas WLC, Fagliari JJ, Almeida KS, Machado RZ, Machado CR: Systemic inflammatory response indicators in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) experimentally infected with sporulated oocysts of *Eimeria stiedai* (Apicomplexa: Eimeriidae). *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20: 121-6
29. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG: Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:71-109
30. Bell RF, Kalso EA: Ketamine for pain management. *Pain* 2018; 3:e674. <http://journals.lww.com/painrpts> Acesso: 12 de dezembro de 2018

**6. CAPÍTULO II: Raquianestesia em coelhos com ropivacaína, cetamina
s (+) e dexmedetomidina – Avaliação de bloqueio sensorial e motor**

Ferreira-Ermita, et al.

Manuscrito redigido conforme as normas do periódico ao qual foi submetido.

Raquianestesia em coelhos com ropivacaína, cetamina s (+) e dexmedetomidina – Avaliação de bloqueio sensorial e motor

[Spinal anesthesia in rabbits with ropivacaine, s (+) ketamine and dexmedetomidine - sensory and motor block evaluation]

Ferreira-Ermita, et al.

Resumo

Objetivo: Avaliar os efeitos analgésicos da associação entre a ropivacaína, cetamina s (+) e dexmedetomidina pela via subaracnóidea em coelhos, visando estabelecer um protocolo de analgesia multimodal eficaz para rotina em anestesia veterinária abdicando da utilização convencional de opioides.

Delineamento experimental: Blocos casualizados

Animais: 20 coelhos Nova Zelândia

Métodos: Os coelhos foram divididos em cinco grupos: grupo controle (GC), grupo cetamina s (+) (GCe), grupo dexmedetomidina (GD), grupo ropivacaína (GR) e grupo associação (GRCeD). Após a indução anestésica com isoflurano, realizou-se a raquianestesia com abordagem paramediana entre as vértebras lombares L5 e L6, administrando-se o fármaco correspondente ao grupo selecionado. O procedimento experimental foi conduzido de forma cega, por três avaliadores experientes, que desconheciam qual fármaco foi administrado a cada animal avaliado. A resposta a um estímulo nociceptivo progressivo foi utilizada para avaliar o grau e a duração do bloqueio sensorial. Adicionalmente, realizou-se o teste de bloqueio da nocicepção térmica por meio da latência de retirada dos membros e resposta de reflexo cutâneo no dorso por contato com uma placa metálica de cobre, aquecida à 60°C. O bloqueio motor foi avaliado para cada membro pélvico por meio de escore qualitativo.

Resultados: A associação entre a cetamina s (+), dexmedetomidina e ropivacaína, pela via subaracnóidea, potencializou a analgesia fornecida pela ropivacaína, promovendo um bloqueio mais cranial e com efeito prolongado. Em dois animais do GD foram relatados efeitos neurológicos e cardiorrespiratórios transitórios, indesejáveis. Todos os animais do GRCeD demonstraram sinais de sedação leve após o bloqueio, sem, contudo,

apresentarem os efeitos indesejáveis observados após a administração de dexmedetomidina isolada.

Conclusões e Relevância clínica: Este estudo demonstrou que a raquianestesia com a associação de cetamina s (+), dexmedetomidina e ropivacaína é um protocolo de analgesia multimodal eficaz para a rotina em anestesia veterinária, com potencialização da analgesia em comparação com a utilização isolada da ropivacaína, e pode ser uma escolha quando não for indicada a utilização de opioides.

Introdução

Sabe-se que a dor envolve mecanismos múltiplos, e por vezes requer a utilização de técnicas multimodais de analgesia, onde cada agente contribui com determinado efeito farmacológico (Otero et al. 2016). Por este motivo, a utilização de bloqueios neuroaxiais, com diferentes classes farmacológicas, vem crescendo nos últimos anos. No entanto, ainda são escassos na literatura veterinária dados sobre a utilização de uma importante técnica neuroaxial: a raquianestesia (Abimussi et al. 2017). A técnica consiste na aplicação de um agente anestésico no espaço subaracnóideo, em contato com o líquido cefalorraquidiano (LCR), sendo também denominada anestesia espinhal, intratecal ou subaracnóidea (Soltész 2010).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado segurança e eficácia na utilização da ropivacaína quando aplicada a estruturas nervosas por via subaracnoidea (Cantürk et al. 2012). Este anestésico local é comumente utilizado para analgesia na medicina humana porque promove menor bloqueio motor (Wangping & Ming 2017). Associar a cetamina à ropivacaína pode melhorar a qualidade analgésica, uma vez que o antagonismo aos receptores N-metil-d-aspartato (NMDA), produzido pela cetamina, pode prevenir estados de hiperexcitabilidade no sistema nervoso central (SNC), reduzindo ainda mais a condução nociceptiva (Jones et al. 2001). Adicionalmente, a cetamina interage com os canais de sódio mimetizando efeitos atribuídos aos anestésicos locais (Wagner II et al. 2001).

Outra forma de potencializar o efeito dos anestésicos locais tem sido demonstrada nos últimos anos e consiste na sua associação com a dexmedetomidina, um potente agonista α -2 adrenérgico, altamente seletivo, com propriedades simpatolíticas, sedativas, amnésicas e analgésicas (Carollo et al. 2008; Giovannitti Jr et al. 2015; Sankararao & Bhairavabhtla 2017), que tem efeito analgésico tal que permite que ela seja descrita como um poupador de opioides (Panzer et al. 2009).

Assim, este estudo utiliza avaliações de bloqueio sensorial e motor com o objetivo de analisar os efeitos analgésicos da associação entre a ropivacaína, cetamina s (+) e dexmedetomidina pela via subaracnóidea em coelhos, visando estabelecer um protocolo de analgesia multimodal eficaz

para a rotina em anestesia veterinária abdicando da utilização convencional de opioides.

Material e métodos

Aspectos éticos

O estudo seguiu a Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos, e foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da instituição de origem, estando de acordo com a legislação vigente.

Delineamento experimental

Foram utilizados vinte coelhos da raça Nova Zelândia, sadios, adultos, com peso médio de 3 Kg, com reflexos sensoriais e motores normais.

Para indução anestésica utilizou-se isoflurano⁵ 2%, diluído em oxigênio 100% em fluxo de 3 l/min, em circuito aberto, com auxílio de máscara, sob respiração espontânea, até a perda do reflexo palpebral. Em seguida, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos homogêneos, de acordo com os fármacos que foram utilizados para a raquianestesia. O grupo GRCeD (grupo ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina) recebeu a associação de ropivacaína⁶ (2 mg/kg), cetamina⁷ (2 mg/kg) e dexmedetomidina⁸ (2 µg/kg) e os grupos GR (grupo ropivacaína), GCe (grupo cetamina) e GD (grupo dexmedetomidina), receberam, respectivamente, ropivacaína (2 mg/kg), cetamina (2 mg/kg) e dexmedetomidina (2 µg/kg), adicionados de solução de cloreto de sódio 0,9% até atingir o volume referente ao que seria administrado se o animal pertencesse ao grupo da associação (GRCeD). Ao GC (grupo controle), foi administrado apenas solução de cloreto de sódio 0,9%, utilizando-se o volume total calculado para a associação.

Para realização da raquianestesia utilizou-se o espaço entre as vértebras lombares L5 e L6 com os animais em decúbito esternal tracionando-se os membros pélvicos cranialmente. O bloqueio foi realizado utilizando a abordagem paramediana, e a localização do espaço L5-L6 foi realizada após

⁵ Isoflurano, solução para inalação – Instituto Biochimico Indústria Farmacêutica Ltda.

⁶ Ropi® - Cloridrato de ropivacaína, solução injetável de 7,5 mg/ml - CRISTÁLIA Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

⁷ Ketamin® – Cloridrato de dextrocetamina, solução injetável de 50 mg/ml - CRISTÁLIA Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.

⁸ Dexdomitor® – Cloridrato de dexmedetomidina, solução injetável de 0,5 mg/ml - ZOETIS Indústria de Produtos Veterinários Ltda.

determinação do espaço L7-S1 seguida de palpação retrógrada dos processos espinhosos até a região alvo. Assim, uma agulha hipodérmica calibre 24G foi introduzida até que o LCR fluísse espontaneamente, em seguida, a raquianestesia foi administrada (Fig. 1A e B) utilizando o fármaco correspondente ao grupo selecionado. Ao término da infiltração raquidiana o fornecimento de isoflurano foi interrompido.

Durante os procedimentos de indução, raquianestesia e recuperação anestésica os coelhos permaneceram sob monitoramento cardiorrespiratório com monitor multiparamétrico e estetoscópio.

Avaliação de bloqueio sensorial e motor

O procedimento experimental foi conduzido de forma cega, por três avaliadores experientes, que desconheciam qual fármaco havia sido administrado a cada animal avaliado. Os testes foram executados antes do bloqueio, após a recuperação anestésica (Rec), determinada pela capacidade de responder a estímulos sonoros, táteis e visuais, e repetidos a cada 30 minutos a contar do horário no qual foi administrada a raquianestesia (R30, R60, R90, etc), até constatada a completa cessação dos bloqueios.

A resposta a um estímulo nociceptivo progressivo foi utilizada para avaliar o grau e a duração do bloqueio sensorial. O estímulo nociceptivo foi aplicado com a pressão progressiva a partir de uma pinça Halsted em ambos os lados das apófises espinhosas vertebrais na direção caudo-cranial a partir da quarta vértebra sacral com o cuidado de encerrar o estímulo antes de causar lesão ao animal, e o número de pontos vertebrais bloqueados foi quantificado para cada grupo. Também foi avaliada a resposta ao reflexo doloroso por meio do pinçamento da cauda e dígitos de ambos os membros pélvicos, como presente ou ausente.

Adicionalmente, realizou-se o teste de bloqueio da nocicepção térmica por meio da latência de retirada dos membros pélvicos e/ou resposta de reflexo cutâneo no dorso (região lombar entre as vértebras L6 e L7) por contato com uma placa metálica de cobre de 4 cm², aquecida à 60°C em banho-maria (Fig. 1C e D). As áreas utilizadas para contato com a placa metálica foram previamente tricotomizadas. A latência de retirada térmica foi medida em cronômetro e registrada. Após 12 segundos, não havendo a

retirada do membro, o contato com a placa era encerrado para que não ocorresse lesão ao animal ou o desenvolvimento de hiperalgesia.

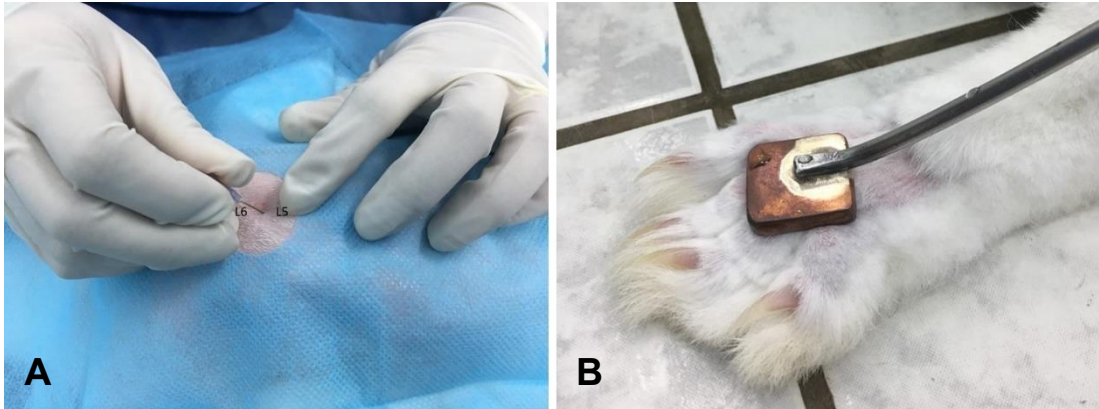


Figura 1: Técnica de raquianestesia e avaliação de nociceção térmica em membro pélvico de coelho. **(A)** punção entre as vértebras lombares 5 e 6, **(B)** contato da placa metálica de cobre com o membro pélvico esquerdo de coelho durante avaliação da nociceção térmica.

O bloqueio motor foi avaliado por meio de escore qualitativo. Para cada membro pélvico, não havendo movimento espontâneo ou evocado, o escore foi considerado zero; havendo movimento parcial, o escore foi 1, e havendo movimento normal, igual àquele observado antes da anestesia, o escore foi categorizado como 2.

Todos os animais tiveram a visão bloqueada com pano de campo durante os testes, para que a perspectiva de tato não influenciasse a avaliação originando falsos resultados.

Análise estatística

Realizou-se análise descritiva para o teste de pinçamento da cauda e dígito em cada grupo, adotando-se os padrões: presente e ausente, e o efeito dos tratamentos foi detectado pelo teste exato de Fisher. Para o número de pontos vertebrais bloqueados, para o tempo de bloqueio motor e para os dados da nociceção térmica empregou-se o teste de Kruskal-Wallis para avaliação do efeito dos tratamentos, e as múltiplas comparações realizada pelo teste *post hoc* de Dunn. Todas as análises foram realizadas no pacote estatístico SPSS 25 (SPSS, IBM, Chicago EUA), adotando-se probabilidade de erro estatístico tipo 1 de 5% ($\alpha=5\%$).

Resultados

O espaço intervertebral L5-L6 foi fácil e rapidamente localizado, não havendo complicações para a execução da técnica. Um animal do grupo controle apresentou reações neurológicas idiossincráticas transitórias após a raquianestesia, como ataxia, espasmo e mioclonia. Em dois animais do GD, foram relatados efeitos indesejáveis transitórios após a aplicação do anestésico: ataxia em membros pélvicos e torácicos, cianose, vocalização e alterações cardiorrespiratórias com redução da frequência cardíaca e aumento da frequência respiratória. Todos os animais do GRCeD demonstraram sinais de sedação leve após o bloqueio, sem, contudo, apresentarem quaisquer efeitos considerados indesejáveis ou adversos, como ocorrido após a administração de dexmedetomidina no GD.

Os animais dos grupos GCe e GRCeD apresentaram tempo de retorno anestésico superior ao observado no GC ($p=0,017$). Sendo o tempo médio de retorno no GCe de 11,75 min, no GRCeD de 14,67 min e no GC de 2,25 min. Os grupos GD e GR tiveram tempo médio de retorno de 6,5 min e 7,75 min, respectivamente, sendo estatisticamente semelhantes ao grupo controle.

O tempo de bloqueio sensorial no GRCeD, determinado pelo pinçamento dos dígitos e da cauda, foi superior ao observado nos demais grupos. Até 90 minutos após a raquianestesia, o bloqueio sensorial foi mantido em todos os animais deste grupo (Tab. 1). O GRCeD também demonstrou maior número de pontos vertebrais bloqueados, além de maior duração no tempo de bloqueio (Tab. 2), neste grupo todos os coelhos apresentaram bloqueio sensorial ao alcance da primeira vértebra lombar, correspondente à 22 pontos de pinçamento bloqueados. Nenhum dos animais avaliados neste estudo apresentou bloqueio unilateral. Os animais controles responderam ao pinçamento da cauda, dígitos e pontos vertebrais exibindo comportamento de fuga.

Tabela 1: Resposta de reflexo sensorial ao pinçamento de dígito e cauda em coelhos submetidos à raquianestesia

Tempo (min)	Reflexo sensorial	Grupos					<i>p</i> -valor*
		GC (n=4)	GR (n=4)	GCe (n=4)	GD (n=4)	GRCeD (n=4)	
Pré	Ausente	0	0	0	0	0	1,000
	Presente	4	4	4	4	4	
Rec	Ausente	0	4	1	0	4	0,000
	Presente	4	0	3	4	0	
30	Ausente	0	4	0	0	4	0,000
	Presente	4	0	4	4	0	
60	Ausente	0	4	0	0	4	0,000
	Presente	4	0	4	4	0	
90	Ausente	0	2	0	0	4	0,000
	Presente	4	2	4	4	0	
120	Ausente	0	0	0	0	1	0,175
	Presente	4	4	4	4	3	
150	Ausente	0	0	0	0	0	1,000
	Presente	4	4	4	4	4	

**p*-valor referente ao teste Exato de Fisher para avaliação do efeito dos tratamentos ($\alpha=5\%$). GC: grupo controle; GR: grupo ropivacaína; GCe: grupo cetamina; GD: grupo dexmedetomidina; GRCeD: grupo ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina.

Tabela 2: Número de pontos vertebrais bloqueados por grupo após a raquianestesia (valores expressos em mediana e intervalo interquartilico)

Tempo (min)	Grupos					<i>p</i> -valor*
	GC	GR	GCe	GD	GRCeD	
Pré	0(0) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	1,000
Rec	0(0) ^a	21(3,5) ^b	12(4,5) ^{ab}	0(3,0) ^a	22(0) ^b	0,001
30	0(0) ^a	21(3,5) ^b	0(4,5) ^{ab}	0(0) ^a	22(0) ^b	0,002
60	0(0) ^a	21(3,5) ^b	0(0) ^a	0(0) ^a	22(0) ^b	0,001
90	0(0) ^a	17(18) ^{ab}	0(0) ^a	0(0) ^a	22(0) ^b	0,003
120	0(0) ^a	0(12) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	17(19) ^a	0,036
150	0(0) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	0(7,5) ^a	0,406
180	0(0) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	0(0) ^a	0(6) ^a	0,406

**p*-valor referente ao teste de Kruskal-Wallis. Para letras diferentes na mesma linha, há diferença estatística de acordo com o teste de Dunn ($p\leq 0,05$). GC: grupo controle; GR: grupo ropivacaína; GCe: grupo cetamina; GD: grupo dexmedetomidina; GRCeD: grupo ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina. Pré: Antes da raquianestesia; Rec: recuperação anestésica.

Os dados obtidos a partir da avaliação da latência de nocicepção térmica corroboram os resultados supracitados. Os grupos avaliados divergiram significativamente em relação ao tempo de antinocicepção térmica. Neste teste, o GRCeD apresentou maior duração da antinocicepção, evidenciada pelo maior tempo para demonstrar resposta nociceptiva ao contato com a placa metálica em comparação ao grupo controle ($p=0,00$), que não evidenciou alterações nesta variável após o bloqueio. A administração

isolada de cetamina s (+), embora não tenha mantido a antinocicepção, mostrou impacto na latência de nocicepção nos tempos de avaliação subsequentes. A figura 2 demonstra o tempo de antinocicepção térmica e o retorno da nocicepção térmica em função do tempo, para cada grupo avaliado, identificado pela latência de retirada dos membros e pelo reflexo cutâneo na região lombar.

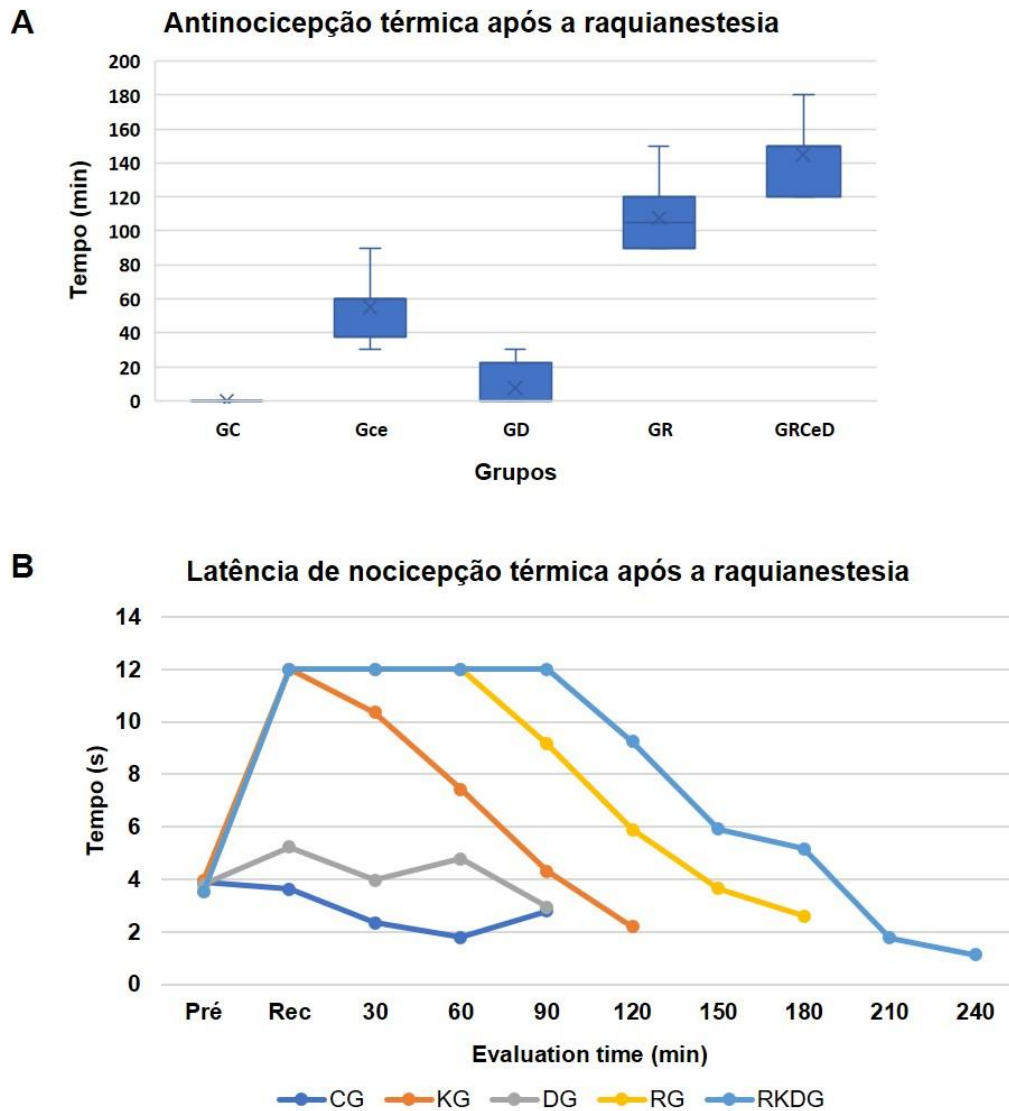


Figura 2: Representações gráficas do tempo de antinocicepção térmica e da latência de nocicepção térmica, por grupo avaliado. **(A)** Tempo de antinocicepção térmica após a raquianestesia, por grupo avaliado, em minutos expresso em mediana (x), intervalo interquartílico (caixa) e valores máximo e mínimo (barras); **(B)** Retorno da nocicepção térmica em função do tempo após a raquianestesia, por grupo avaliado. GC: grupo controle; GR: grupo ropivacaína; GCe: grupo cetamina; GD: grupo dexmedetomidina; GRCeD: grupo ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina. Pré: Antes da raquianestesia; Rec: recuperação anestésica.

Para o tempo de bloqueio motor o GRCeD mais uma vez, demonstrou maior duração, sendo, porém, estatisticamente semelhante ao GR e ao GCe (Tab. 3). Os animais do GC não apresentaram sinais de comprometimento motor, e o GD, em função do curto tempo de bloqueio motor, mostrou-se estatisticamente semelhante ao GC.

Tabela 3: Tempo de bloqueio motor por grupo após raquianestesia (valores expressos em mediana e intervalo interquartílico)

Grupo	Tempo de bloqueio motor (min)
GC	0(0) ^a
GR	165(75) ^b
GCe	60(22,5) ^{ab}
GD	45(52,5) ^a
GRCeD	195(52,5) ^b

Para letras diferentes na mesma coluna, há diferença estatística de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). GC: grupo controle; GR: grupo ropivacaína; GCe: grupo cetamina; GD: grupo dexmedetomidina; GRCeD: grupo ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina.

A tabela 4 demonstra os efeitos da raquianestesia sob os escores obtidos na avaliação de bloqueio motor em função do tempo, por animal, por grupo avaliado.

Tabela 4: Escore de bloqueio motor por grupo avaliado em função do tempo

Grupo/n	Escore de bloqueio motor										
	Pré	Rec	R30	R60	R90	R120	R150	R180	R210	R240	
GRCeD	1	2	0	0	0	0	0	1	1	2	2
	2	2	0	0	0	0	0	1	1	2	2
	3	2	0	0	0	0	1	1	2	2	2
	4	2	0	0	0	0	1	2	2	2	2
GR	1	2	0	0	0	0	1	1	2	2	2
	2	2	0	0	1	1	1	2	2	2	2
	3	2	0	0	0	0	0	1	1	1	2
	4	2	0	0	0	1	1	2	2	2	2
GD	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	3	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	4	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2
GCe	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	0	1	2	2	2	2	2	2	2
	3	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	4	2	0	1	1	2	2	2	2	2	2
GC	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

0 = bloqueio motor total; 1 = bloqueio motor parcial; 2 = sem bloqueio motor. GC: grupo controle; GR: grupo ropivacaína; GCe: grupo cetamina; GD: grupo dexmedetomidina;

GRCeD: grupo ropivacaína, cetamina e dexmedetomidina; n: número do animal por grupo.
Pré: Antes da raquianestesia; Rec: recuperação anestésica.

Discussão

Os resultados alcançados neste estudo, a partir das avaliações dos bloqueios sensorial e motor, demonstraram que associar cetamina s (+) e dexmedetomidina à ropivacaína, pela via subaracnóidea, pode potencializar a analgesia fornecida pela ropivacaína, promovendo um bloqueio sensorial e motor mais cranial e com efeito prolongado. Este protocolo é um exemplo clássico de analgesia neuroaxial multimodal e a associação das propriedades farmacológicas destes três agente resultou em um protocolo de analgesia eficaz, que pode ser utilizado na rotina anestesiológica sendo uma opção viável quando não recomendada a utilização de analgésicos opioides para o controle da dor.

Demonstrou-se, também, que tanto a dexmedetomidina quanto a cetamina s (+) aumentam o tempo de ação da ropivacaína, entretanto os mecanismos pelos quais tal efeito ocorre ainda não estão claramente elucidados na literatura. Wagner II et al. (2001) relataram que a cetamina atua em canais de sódio de uma maneira semelhante aos anestésicos locais, e que quando estes canais são bloqueados pela cetamina demonstram maior tempo para recuperação da inativação, em comparação com bloqueio promovido pelos anestésicos locais. Em relação à dexmedetomidina, Brummett et al. (2011) associando este fármaco à ropivacaína para bloqueio do nervo ciático em ratos observaram que o tempo de bloqueio da ropivacaína quase dobrou, e esse efeito foi revertido pela utilização de um estimulador da corrente de cátions ativada por hiperpolarização, mas não por um antagonista do receptor α_2 adrenérgico. Este fato leva a crer que a dexmedetomidina prolonga o efeito da ropivacaína por mecanismos não relacionados à sua principal via de ação.

Os dados da nocicepção térmica reforçaram estes resultados, evidenciando analgesia ao nível espinhal promovida pela associação destes fármacos, com tempo de duração de aproximadamente um quarto a mais do que a analgesia promovida somente pela ropivacaína. O aumento na latência de nocicepção térmica no GCe, bem como o perfil de bloqueio motor evidenciado neste grupo e a necessidade de um estímulo maior no teste do pinçamento para a externalização de uma resposta efetiva, demonstra a contribuição da cetamina s (+) nestes resultados.

Acredita-se que o efeito de sedação, observado no GRCeD se deu, principalmente, em função da cetamina s (+), não rejeitando a contribuição de possíveis efeitos sedativos já bem relatados da dexmedetomidina. Porém, o GCe demonstrou aumento significativo no tempo de retorno anestésico, e tal efeito não foi observado no GD com a dose de dexmedetomidina utilizada. A cetamina é uma droga com múltiplas vias de ação e pode promover sedação de acordo com a dose utilizada, como descrito por Zhu et al. (2015).

Existe ainda a resistência na medicina veterinária em relação à utilização da raquianestesia, e geralmente está relacionada aos possíveis efeitos colaterais da técnica, como a depressão cardiorrespiratória e hipotensão ou danos neurológicos. Porém, os benefícios que esta técnica pode trazer comparada à técnica epidural, como a menor taxa de falha, menor risco de resposta cardiovascular intraoperatória à estimulação cirúrgica e mais rápida resolução de bloqueio motor, demonstrado por Sarotti et al. (2015), devem ser considerados, e protocolos alternativos devem continuar a ser estudados a fim de tornar esta prática natural à rotina anestesiológica veterinária tanto quanto é na anestesiologia humana.

A utilização da dexmedetomidina como sedativo e como analgésico adjuvante em bloqueios neuroaxiais tem sido amplamente estudada nos últimos anos (Giovannitti Jr et al. 2015; Grant et al. 2015; Debbarma et al. 2017; Sankararao & Bhairavabhtla 2017). No entanto, os efeitos adversos da administração da dexmedetomidina, como aqueles observados neste experimento, são pouco relatados. As pesquisas dão destaque aos seus efeitos sedativos, ansiolíticos e a sua capacidade de prologar o bloqueio sensorial e motor produzido pelos anestésicos locais.

A vocalização e a ataxia observadas no GD evidenciaram a ocorrência de excitação com a utilização subaracnóidea da dexmedetomidina. Acredita-se que a estimulação dos receptores adrenérgicos α_2A e α_2C (encontrados principalmente no SNC), responsável, segundo Giovannitti Jr et al. (2015), pelos efeitos sedativos e analgésicos deste fármaco, foi também, o que determinou os efeitos excitatórios observados neste estudo após a administração da dexmedetomidina. Há quase 40 anos, efeitos semelhantes foram relatados em ratos com a utilização de agonistas de receptores α_2 (Van Meel et al. 1981). Mais recentemente, relatos de agitação paradoxal em

humanos foram associados à utilização de doses mais altas de dexmedetomidina em infusões contínuas, ocorrendo aumento de 14% na incidência de efeitos adversos com a utilização de doses superiores a 1,1µg/kg/h (Zhu et al. 2015), o que sugere que a dose de 2µg/kg, utilizada neste estudo, pode ter desencadeado estes efeitos indesejáveis.

Doses mais altas de dexmedetomidina ou a administração em bolus, podem desencadear episódios transitórios de hipertensão seguidos de hipotensão (Giovannitti Jr et al. 2015). De acordo com Bos et al. (2017), a administração de dexmedetomidina inicialmente causa um aumento na PaCO₂, seguido por um aumento compensatório na frequência respiratória. Este fenômeno é conhecido como excitação hipercápnica e pode ter sido a causa das alterações cardiorrespiratórias observadas no GD. Os efeitos adversos da administração de dexmedetomidina não foram observados grupo GRCeD, acredita-se que podem ter sido atenuados pela ação simpatomimética atribuída à cetamina (Mohamed et al. 2016; Patterson et al. 2017).

Em conclusão, este estudo demonstrou que a raquianestesia com a associação de cetamina, dexmedetomidina e ropivacaína é um protocolo de analgesia multimodal eficaz para a rotina em anestesia veterinária, com potencialização da analgesia em comparação com a utilização isolada da ropivacaína, e pode ser um protocolo utilizado na rotina e também uma alternativa quando não indicada a utilização de opioides em bloqueios neuroaxiais.

Referências

Abimussi CJX, Floriano BP, Wagatsuma JT et al. (2017) Eficácia e efeitos hemodinâmicos da anestesia raquidiana com ropivacaína isobárica, hipobárica ou hiperbárica em cães anestesiados com isoflurano. *Pesq Vet Bras* 37, 137-144.

Bos M, Janssen M, Smeets A et al. (2017) Use of dexmedetomidine during deep brain stimulation for Tourette Syndrome: a case report and review of the literature. *Anesthesia cases*, <http://dx.doi.org/10.21466/ac.UODDDBS.2017>

Brummett CM, Hong EK, Janda AM et al. (2011) Perineural Dexmedetomidine Added to Ropivacaine for Sciatic Nerve Block in Rats Prolongs the Duration of Analgesia by Blocking the Hyperpolarization-activated Cation Current. *Anesthesiology* 115, 836-843.

Cantürk M, Kilci O, Ornek D et al. (2012) Ropivacaína para Raquianestesia Unilateral: Hiperbárica ou Hipobárica? *Rev Bras Anesthesiol* 62, 298-311.

Carollo DS, Nossaman BD, Ramadhyani U (2008) Dexmedetomidine: a review of clinical applications. *Curr Opin Anaesthesiol* 21, 457-461.

Debbarma MK, Meitei AJ, Singh LP et al. (2017) Effect of intravenous and epidural dexmedetomidine on spinal block in lower limb and lower abdominal surgeries. A comparative study. *Int J Sci Res* 6, 132-135.

Giovannitti Jr JA, Thoms SM, Crawford JJ (2015) Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications. *Anesth Prog* 62, 31-38.

Grant R, Gruenbaum SE, Gerrard J (2015) Anaesthesia for deep brain stimulation: a review. *Curr Opin Anesthesiol* 28, 505-510.

Jones MW, Macclean M, Parsons CG et al. (2001) The *in vivo* relevance of the varied channel-blocking properties of uncompetitive NMDA antagonists: tests on spinal neurones. *Neuropharmacology* 41, 50-61.

Mohamad RL, Tang SSP, Yahya N et al. (2016) Comparison between effects of ketamine and midazolam as co-induction agents with propofol for proseal™ laryngeal mask insertion. *Sri Lankan J Anaesth* 24, 16-21.

Otero ARS, Barbosa VF, Carneiro RL et al. (2016) Avaliação da infusão contínua de dexmedetomidina ou dexmedetomidina-midazolam sobre variáveis cardiorrespiratórias e qualidade da recuperação anestésica, em cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia. *Rev Bras Med Vet* 38, 168-174.

Panzer O, Moitra V, Sladen RN (2009) Pharmacology of sedative-analgesic agents: dexmedetomidine, remifentanyl, ketamine, volatile anesthetics, and the role of peripheral mu antagonists. *Crit Care Clin* 25, 451-469.

Patterson AC, Wadia SA, Lorenz DJ et al. (2017) Changes in blood pressure and heart rate during sedation with ketamine in the pediatric ED. *Am J Emerg Med* 35, 322-325.

Sankararao DV, Bhairavabhatla KV (2017) A comparative study of intrathecal dexmedetomidine and fentanyl as adjuvants to bupivacaine. *J Evid Based Med Healthc* 4, 3092-3097.

Sarotti D, Rabozzi R, Franci P (2015) Comparison of epidural versus intrathecal anaesthesia in dogs undergoing pelvic limb orthopaedic surgery. *Vet Anaesth Analg* 42, 405-413.

Soltész S (2010) Spinalanästhesie: doctor consult. *J Wissen für klinik und Praxis* 1, 137-143.

Van Meel JC, Dejonge A, Timmermans PBM et al. (1981) Selectivity of some alpha adrenoceptors in the normotensive rat. *J Pharmacol Exp Ther* 219, 760-767.

Wagner II LE, Gingrich KJ, Kulli JC et al. (2001) Ketamine Blockade of Voltage-gated Sodium Channels - Evidence for a Shared Receptor Site with Local Anesthetics. *Anesthesiology* 95, 1406-1413.

Wangping Z, Ming R (2017) Optimal dose of epidural dexmedetomidine added to ropivacaine for epidural labor analgesia: A pilot study. *Evid Based Complement Alternat Med*, <https://doi.org/10.1155/2017/7924148>

Zhu M, Wang H, Zhu A et al. (2015) Meta-analysis of dexmedetomidine on emergence agitation and recovery profiles in children after sevoflurane anesthesia: different administration and different dosage. PloS One 10, 1-22.

7. CONCLUSÃO GERAL

Este estudo demonstrou que a raquianestesia com a associação de cetamina, dexmedetomidina e ropivacaína é um protocolo de analgesia multimodal eficaz para a rotina em anestesia veterinária, com potencialização da analgesia em comparação com a utilização isolada da ropivacaína, e pode ser uma escolha quando não se deseja utilizar opioides. A utilização dessa associação pela via subaracnóidea mostrou-se segura não causando danos ao SNC. Com base nos resultados obtidos nas análises do LCR e na avaliação histopatológica da medula espinhal, este protocolo não desencadeia efeitos neurotóxicos e possivelmente pode contribuir com efeitos neuroprotetores. Assim, esta associação tem sua utilização justificada não apenas pelos benefícios analgésicos que estes fármacos podem proporcionar, mas também, pela segurança na sua aplicabilidade.

Anexo 1: Planilha para avaliação de bloqueio sensorial e nocicepção térmica

AVALIAÇÃO DE BLOQUEIO SENSORIAL

Animal _____

Tempo	Reflexo (dígitos)	Reflexo (Cauda)	Dermátomos bloqueados	Nocicepção térmica	Observações
T: Pré	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: Rec	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R30	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R60	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R90	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R120	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R150	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R180	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	

T: R210	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R240	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R270	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R300	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R330	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R360	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R390	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R420	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R450	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	
T: R480	Presente	Presente		Presente	Tempo:
H:	Ausente	Ausente		Ausente	

Anexo 2: Planilha para avaliação de bloqueio motor

AVALIAÇÃO DE BLOQUEIO MOTOR

Animal _____

Tempo	Escore MPD		Escore MPE		Observações
T: Pré		0		0	
H:		1		1	
		2		2	
T: R0		0		0	
H:		1		1	
		2		2	
T: R30		0		0	
H:		1		1	
		2		2	
T: R60		0		0	
H:		1		1	
		2		2	
T: R90		0		0	
H:		1		1	
		2		2	
T: R120		0		0	
H:					

		1		1	
		2		2	
T: R150		0		0	
H:		1		1	
		2		2	
T: R180		0		0	
H:		1		1	
		2		2	
T: R210		0		0	
H:		1		1	
		2		2	
T: R240		0		0	
H:		1		1	
		2		2	
T: R270		0		0	
H:		1		1	
		2		2	
T: R300		0		0	
H:		1		1	
		2		2	

Anexo 3: Relatório fotográfico do estudo

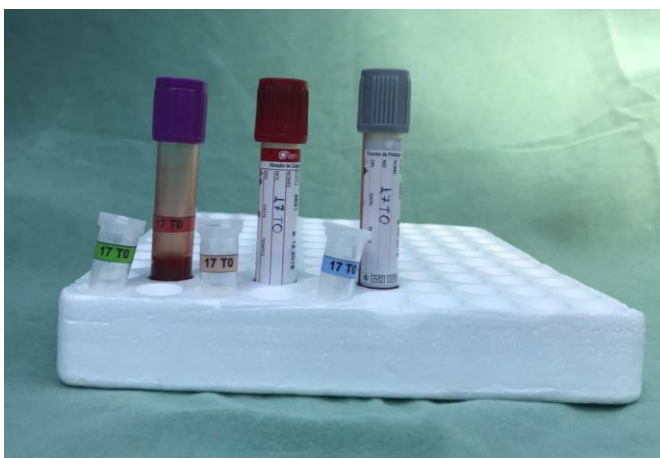


Figura 1: Material para colheita de sangue e líquido cefalorraquidiano.

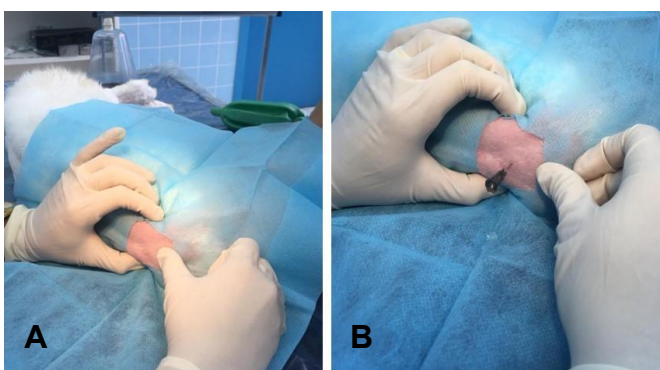


Figura 2: Técnica de colheita do LCR. **(A)** Localização da protuberância occipital (dedo polegar direito) e das asas do atlas (dedos polegar e indicador esquerdos); **(B)** inserção perpendicular de agulha calibre 22G entre os pontos de referência para colheita do LCR.

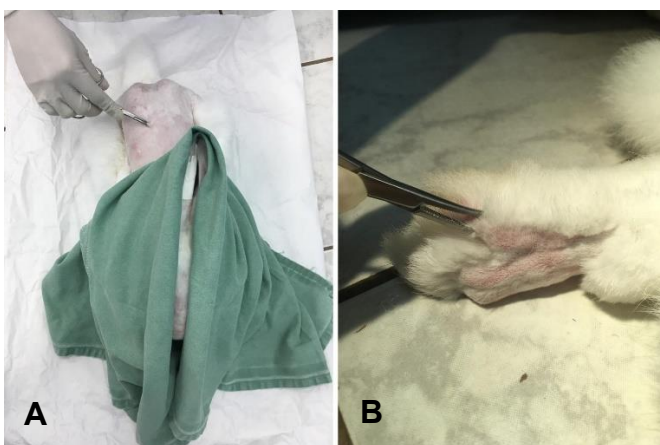


Figura 3: Teste de bloqueio sensorial por pinçamento com pinça de Halsted. **(A)** pinçamento da pele, sob a espinhosa vertebral e **(B)** pinçamento do dígito em membro pélvico.



Figura 4: Teste da nociceção térmica. **(A)** Aquecimento das placas metálicas de cobre à 60°C em banho-maria; **(B)** contato da placa metálica com a região dorsal do membro posterior para avaliação da latência de nociceção térmica.

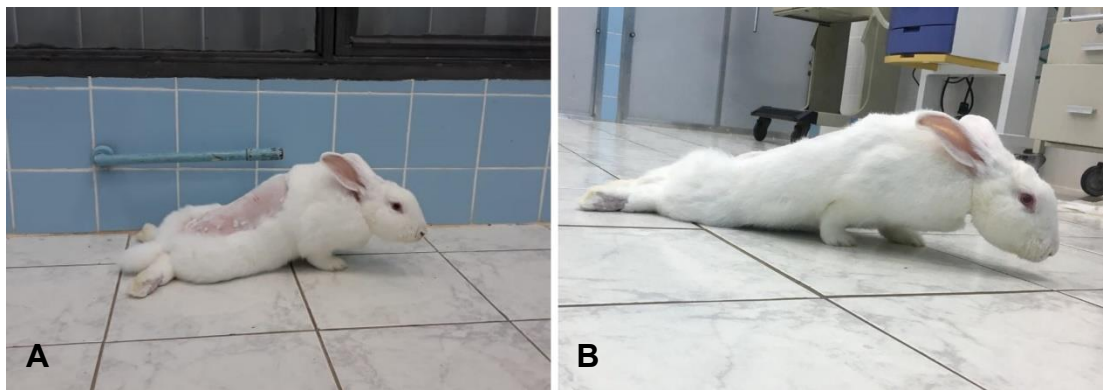


Figura 5: Coelhos com bloqueio motor reversível de escore zero. **(A)** coelho do GRcEd e **(B)** coelho do GR sem tônus muscular e sem capacidade locomotora nos membros pélvicos.



Figura 6: Procedimento cirúrgico para remoção da coluna vertebral a partir de L3 até S4.

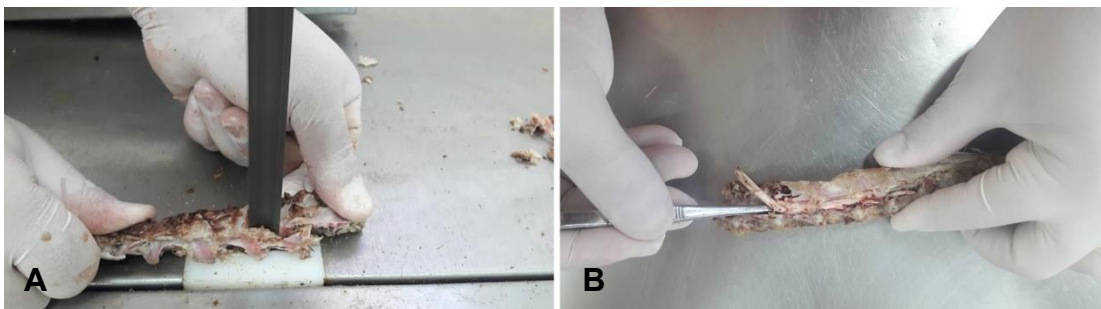


Figura 7: Remoção das vértebras e extração da medula espinal após 24h de fixação em formalina 10%. **(A)** Serragem do processo espinhoso das vértebras e **(B)** extração da medula espinal.

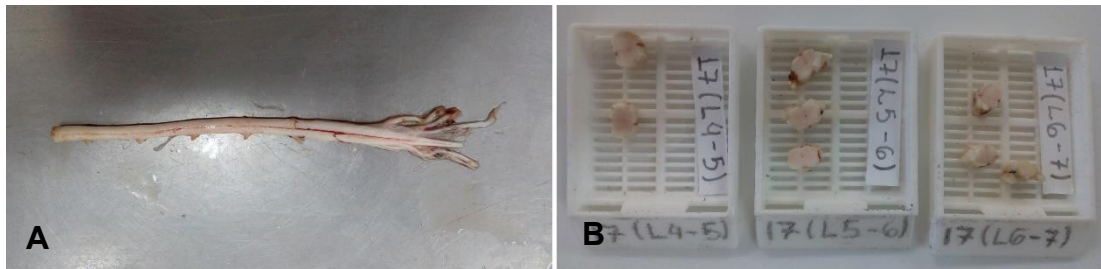


Figura 8: Medula espinal de coelho. **(A)** Medula espinal após remoção das vértebras; **(B)** cortes transversais da medula espinal para inclusão em parafina e elabora das lâminas para avaliação histológica.

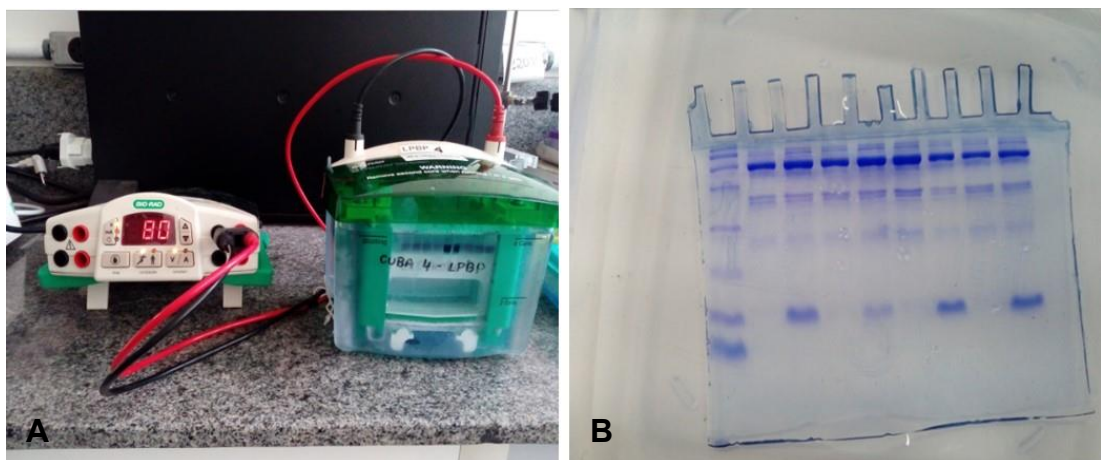


Figura 9: Eletroforese unidimensional. **(A)** Corrida dos géis na cuba de eletroforese, à 80v; **(B)** Mini-gel após coloração com Coomassie Brilliant Blue.



Figura 10: Responsável pela execução (ao centro) e equipe de apoio.