



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação dos efeitos neurotóxicos da administração intratecal do (S)-(+)-cetoprofeno em medula espinhal de rato: estudo experimental randômico e controlado[☆]



Cengiz Kaya ^{a,*}, Yunus O. Atalay ^b, Bilge C. Meydan ^c, Yasemin B. Ustun ^a, Ersin Koksak ^a e Sultan Caliskan ^c

^a Ondokuz Mayıs University, School of Medicine, Department of Anesthesiology, Kurupelit, Turquia

^b Ondokuz Mayıs University, School of Medicine, Department of Radiology, Kurupelit, Turquia

^c Ondokuz Mayıs University, School of Medicine, Department of Pathology, Kurupelit, Turquia

Recebido em 10 de outubro de 2018; aceito em 17 de março de 2019

Disponível na Internet em 29 de julho de 2019

PALAVRAS-CHAVE

Inibidor da ciclooxigenase;
Injeção intratecal;
(S)-(+)-cetoprofeno;
Neurotoxicidade;
Inflamação

Resumo

Justificativa e objetivos: A administração intratecal de anti-inflamatórios não esteroides é mais eficaz no tratamento da dor pós-operatória. Anti-inflamatórios não esteroides, como o (S)-(+)-cetoprofeno, pode ser eficaz em doses intratecais inferiores às parenterais. A segurança pré-clínica relativa à possível neurotoxicidade associada ao (S)-(+)-cetoprofeno intratecal não foi avaliada. Neste estudo avaliamos a neurotoxicidade do (S)-(+)-cetoprofeno administrado por via intratecal em ratos.

Métodos: Conduzimos um estudo experimental randomizado e controlado por placebo em ratos Sprague-Dawley (250–300 g) com idades entre 12 e 16 semanas. Eles foram randomicamente divididos em dois grupos de tratamento [100 e 800 µg de (S)-(+)-cetoprofeno] e um de controle (água estéril). Cateteres intratecais foram colocados através do espaço atlantoaxial nos ratos anestesiados. Testes de pinça, avaliações da função motora e exames histopatológicos da medula espinhal e das raízes nervosas foram realizados nos dias 3, 7 e 21 do estudo. Os cortes da medula espinhal foram avaliados por microscopia de luz para vacuolização do funículo axonal dorsal, perda de mielina axonal, cromatólise neuronal, neurite, inflamação, aderências e fibrose das meninges.

Resultados: Em todos os grupos, os ratos exibiram resposta normal ao teste de pinça (pontuação = 0) e marcha normal em cada tempo observado (escore de avaliação da função motora = 1). A neurotoxicidade foi maior com os tratamentos nos dias 3 e 7 do que no dia 21 (2, 3, 0, $p = 0,044$; 2, 5, 0, $p = 0,029$, respectivamente). No dia 7, os escores totais refletindo o dano neuronal foram maiores no grupo com 800 µg que nos grupos com 100 µg e controle (5, 3, 0, $p = 0,048$, respectivamente).

[☆] Os dados preliminares deste estudo foram enviados para uma apresentação em pôster no Congresso da Sociedade Turca de Anestesiologia e Reanimação, de 26 a 30 de outubro de 2016, em Istambul, Turquia. O estudo experimental randômico e controlado por placebo foi conduzido no Centro de Pesquisa e Aplicação de Experimentos em Animais, Samsun, Turquia.

* Autor para correspondência.

E-mail: cengiz.kaya@omu.edu.tr (C. Kaya).

<https://doi.org/10.1016/j.bjan.2019.03.006>

0034-7094/© 2019 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Cyclooxygenase inhibitor;
Intrathecal injection;
(S)-(+)-Ketoprofen;
Neurotoxicity;
Inflammation

Conclusão: A administração intratecal de (S)-(+)-cetoprofeno causou alterações neuro-histopatológicas dose-dependentes em ratos nos dias 3 e 7 após a aplicação e sugerindo que o (S)-(+)-cetoprofeno não deve ser administrado por via intratecal.

© 2019 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Evaluation of the neurotoxic effects of intrathecal administration of (S)-(+)-Ketoprofen on rat spinal cords: randomized controlled experimental study

Abstract

Background and objectives: Intrathecal administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs is more efficacious for post-operative pain management. Cyclooxygenase inhibiting non-steroidal anti-inflammatory drugs like (S)-(+)-Ketoprofen, may be effective at lower intrathecal doses than parenteral ones. Preclinical safety regarding possible neurotoxicity associated with the intrathecal (S)-(+)-Ketoprofen was not evaluated. Here we analysed the neurotoxicity of intrathecally administered (S)-(+)-Ketoprofen in rats.

Methods: A randomized placebo-controlled experimental study was conducted. Sprague-Dawley rats (250–300 g) aged 12–16 weeks were randomly divided into 2 treatments [100 and 800 µg (S)-(+)-Ketoprofen] and control (sterile water) groups. Intrathecal catheters were placed via the atlantoaxial space in anesthetized rats. Pinch-toe tests, motor function evaluations and histopathological examinations of the spinal cord and nerve roots were performed at days 3, 7 and 21. Spinal cord sections were evaluated by light microscopy for the dorsal axonal funiculus vacuolation, axonal myelin loss, neuronal chromatolysis, neuritis, meningeal inflammation, adhesions, and fibrosis.

Results: Rats in all the groups exhibited normal pinch-toe testing response (score = 0) and normal gait at each observed time (motor function evaluation score = 1). Neurotoxicity was higher with treatments on days 3 and 7 than that on day 21 (2, 3, 0, $p=0.044$; 2, 5, 0, $p=0.029$, respectively). On day 7, the total scores reflecting neuronal damage were higher in the 800 µg group than those in the 100 µg and Control Groups (5, 3, 0, $p=0.048$, respectively).

Conclusion: Intrathecal (S)-(+)-Ketoprofen caused dose-dependent neurohistopathological changes in rats on days 3 and 7 after injection, suggesting that (S)-(+)-Ketoprofen should not be intrathecally administered.

© 2019 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

A dor pós-operatória é causada por lesão tecidual e pela desregulação da homeostase fisiológica.¹ A depender do tipo de cirurgia, 75% dos pacientes sentem dor pós-operatória e 80% relatam dor intensa.² Os agentes opioides são frequentemente usados como analgésicos no pós-operatório, mas causam efeitos colaterais, como depressão respiratória, sedação, náusea, vômito e prurido.³ A analgesia multimodal, que geralmente inclui medicamentos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), diminui as doses de opioides e os efeitos colaterais e aumenta o alívio da dor mediante efeitos aditivos ou sinérgicos.^{3,4} Contudo, as doses de AINEs administradas sistemicamente causam efeitos colaterais, inclusive ulceração gástrica, redução do fluxo sanguíneo renal e inibição da função plaquetária. Alternativamente, os AINEs podem ser administrados por via intratecal com doses 100–300 vezes menores, potencialmente leva a efeitos colaterais reduzidos.^{5,6} Outros estudos indicaram que o (S)-(+)-cetoprofeno (dexcetoprofeno) tem menos efeitos

colaterais e uma atividade analgésica maior do que os AINEs convencionais.^{7,8}

Animais usados como modelos experimentais em estudos de dor demonstraram que o uso intratecal de AINEs provoca um aumento na atividade da ciclo-oxigenase na medula espinhal e uma diminuição na percepção de dor. No entanto, um número limitado de estudos foi feito com seres humanos.⁹ Em voluntários saudáveis, Eisenach et al.¹⁰ descobriram que doses crescentes de ceterolaco intratecal (0,25–2 mg) não tiveram um impacto significativo na resposta aos estímulos nocivos de calor intenso em pele normal. Não houve efeitos colaterais neurológicos ou cardiorrespiratórios, embora tenha havido uma redução pequena, mas estatisticamente significativa, na frequência cardíaca por uma hora (h) após a injeção de ceterolaco.¹⁰ No estudo com voluntários saudáveis, também foi descoberto que 2 mg de ceterolaco intratecal exerceram efeitos mínimos sobre a dor nociceptiva aguda e a dor neuropática crônica, embora o medicamento tenha sido mais eficaz em modelos de dor com componentes inflamatórios e de hipersensibilidade, tais

como dor pós-operatória e artrite.⁹ Em ambos os estudos, o único efeito colateral foi uma dor de cabeça leve, enquanto nenhum efeito colateral tardio foi observado por até seis meses após o término do estudo. Em um estudo do mesmo grupo com pacientes que apresentavam dor crônica, o aumento das doses de cetorolaco intratecal (0,5–2,0 mg) causou uma redução nos escores de dor e cefaleia leve ou moderada e náusea foram os efeitos colaterais mais frequentemente observados.¹¹ Embora existam poucos efeitos colaterais associados aos AINEs, estudos adicionais que usem doses repetidas ou formulações desses medicamentos com conservantes são necessários antes que os AINEs possam ser introduzidos na prática clínica de rotina. O AINE não seletivo (S)-(+)-cetoprofeno inibe a ciclooxigenase-1 e a ciclooxigenase-2, leva à redução da sensibilidade periférica e das respostas nociceptivas de áreas inflamadas e à inibição central das curvas *Wind-up* (soma temporal da dor depois de repetidas simulações nociceptivas), que são mediadas por neurônios nociceptivos da medula espinhal.^{7,12} Segundo Cabré et al.,¹³ o (S)-(+)-cetoprofeno é mais antinociceptivo do que o (R)-(-)-cetoprofeno; os pesquisadores atribuíram a diferença entre os enantiômeros à estereosseletividade.

Considerando a eficácia do (S)-(+)-cetoprofeno, seu uso intratecal poderia ser uma escolha melhor para o tratamento da dor, se não houvesse neurotoxicidade. Porém, a neurotoxicidade do (S)-(+)-cetoprofeno não foi avaliada em estudos anteriores. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar clínica e histopatologicamente a neurotoxicidade potencial de diferentes doses de (S)-(+)-cetoprofeno intratecal em ratos.

Métodos

Animais

O protocolo experimental deste estudo foi revisado e aprovado pela Comissão para o Cuidado e Uso de Animais (Comitê de Ética, nº 2013/28). Ratos Sprague-Dawley machos ($n=27$), com 12–16 semanas e 250–300 g (Centro de Pesquisa e Aplicação de Experimentos em Animais), foram mantidos em gaiolas individuais, com ciclos de 12 h de claro e 12 h de escuro em temperatura ambiente de 20–22 °C e livre acesso à água e alimentos. O peso corporal foi avaliado antes da injeção intratecal dos medicamentos (dados basais) e três, sete e 21 dias após a injeção.

Crítérios de exclusão

Ratos que apresentaram anormalidades na função sensorial ou motora, déficits comportamentais ou neurológicos durante o intervalo de três dias entre a colocação do cateter e a injeção intratecal do (S)-(+)-cetoprofeno. Também foram excluídos os ratos que desenvolveram uma infecção durante o acompanhamento, bem como aqueles cuja ponta do cateter estava incorretamente colocada, o que foi descoberto durante laminectomia subsequente. Os ratos com cateter incorretamente colocado e sem paralisia nas patas traseiras 30s após a administração de cloridrato de lidocaína através do cateter no dia seguinte à sua colocação também foram

excluídos do estudo. Os ratos excluídos foram substituídos por novos ratos.

Administração intratecal

Para o procedimento cirúrgico, os ratos receberam injeção intraperitoneal de cetamina (80–100 mg.kg⁻¹) e xilazina (5–10 mg.kg⁻¹), o que permitiu aos ratos continuar a respirar espontaneamente. O cateter intratecal foi colocado através da membrana atlanto-occipital com o método descrito por Yaksh e Rudy¹⁴ e modificado por Korkmaz et al.¹⁵ Primeiro, os ratos foram anestesiados e, em seguida, posicionados em decúbito ventral e presos por um aparelho cirúrgico estereotáxico. A pele foi esterilizada e uma incisão foi feita na região occipitocervical para expor a membrana atlanto-occipital. Após observar o líquido cefalorraquidiano através de uma pequena incisão na membrana, um cateter ALZET® (PU-10 28G, Durect Corporation, Cupertino, CA, EUA) foi introduzido 8 cm caudalmente. O tecido muscular e subcutâneo foi suturado e a ponta externa do cateter foi fixada à pele. O cateter foi lavado com 10 µL de solução salina estéril e a ponta foi então coberta com fita adesiva.

Antibioticoterapia com cefazolina intraperitoneal (40 mg.kg⁻¹.day⁻¹) foi administrada a cada rato, iniciou no dia anterior à cirurgia e continuou por seis dias. Após a reversão da anestesia, os ratos foram colocados em gaiolas individuais e monitorados.

Para verificar a localização do cateter, 10 µL de cloridrato de lidocaína a 2% (200 µg) foram administrados via cateter, seguidos de 10 µL de solução salina estéril no dia seguinte à cirurgia. A paralisia motora bilateral nas pernas traseiras dentro de 30s após a injeção indicou que o cateter foi colocado corretamente. Os ratos foram então monitorados por três dias para observação de marcha irregular, deformidade da coluna vertebral e anormalidades comportamentais.

Preparação do medicamento

Uma mistura de 200 mg de (S)-(+)-cetoprofeno (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), 3 mL de água estéril sem conservantes e 1 M de NaOH (0,2 mL) foi preparada para um volume total de 5 mL, com uma concentração de 40 g.µL⁻¹ e um pH que variou de 7 a 7,4.

Os ratos foram randomicamente distribuídos para um dos três grupos de estudo:

- Grupo C (controle) – 20 µL de água estéril ($n=9$);
- Grupo 1 – 2,5 µL da mistura de 100 µg de (S)-(+)-cetoprofeno e 17,5 µL de água estéril ($n=9$);
- Grupo 2 – 20 µL da mistura de 800 µg de (S)-(+)-cetoprofeno ($n=9$).

Após a aplicação do medicamento, 10 µL de solução salina estéril foram injetados no cateter. Todas as aplicações do medicamento e de solução salina estéril foram feitas com uma seringa para cateter intratecal (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Suíça).

Avaliação neurofuncional

Para avaliar a função do sistema nervoso em vários níveis nos ratos, testes de pinçamento foram feitos no 3^o, 7^o e 21^o dias após a injeção por um pesquisador, cego para o procedimento experimental.

Testes de pinçamento

Foram executados com a aplicação de pressão nas superfícies dorsais do dedo lateral com uma pinça cirúrgica obtusa por um máximo de 6 s. Os testes de pinçamentos compressivos foram aplicados a intervalos de 5 min por até três vezes. Nessas condições, estímulos mecânicos nocivos profundos são suficientes para causar movimentos reflexivos, mas não causam danos aos ratos. As reações nocifencivas (reações de resposta à dor) foram classificadas com escores de 0 a 3 com base nos reflexos de retração, nas tentativas de morder a pinça e na vocalização. Os escores das reações nocifensivas foram gerados, conforme descrito por Bajrovic et al.,¹⁶ com algumas modificações. De acordo com esse sistema de classificação, o escore 0 é considerado normal e atribuído se o rato apresentar uma vocalização forte, a retirada reflexiva do membro e morder a pinça, dentro de segundos quando o membro posterior é comprimido; o escore 1 indica um comprometimento leve das respostas; o escore 2 corresponde a um comprometimento moderado e o escore 3 é atribuído aos ratos que não respondem. Escores ≥ 1 são considerados anormais e indicativos de danos nos nervos motores e sensoriais.

Avaliações da função motora

As funções motoras foram avaliadas de acordo com a marcha e o posicionamento do membro posterior e classificadas com escores de 1 a 4. Para avaliar os distúrbios motores, usamos os escores descritos por Chataniet et al.¹⁷ com algumas modificações: 1 – marcha normal e sem paresia motora; 2 – marcha normal, mas leve irregularidade dos membros posteriores, como flexão plantar dos dedos; 3 – marcha levemente desordenada e/ou inversão da pata traseira; 4 – posição incorreta da pata com claudicação significativa. Escores ≥ 2 foram considerados indicativos de lesão no nervo motor.

Avaliação histopatológica

Três ratos de cada grupo foram submetidos à eutanásia por anestesia inalatória e avaliados no 3^o, 7^o e 21^o dias após a injeção. O ventrículo esquerdo foi canulado e perfundido com 50 mL de tampão fosfato (0,2M), seguido de 400 mL de paraformaldeído a 4%. Laminectomias bilaterais foram feitas (fig. 1).

Três blocos de tecido foram preparados a partir dos espécimes extraídos da ponta do cateter e 0,5 cm rostral e 0,5 cm caudal à ponta do cateter. Quatro lâminas com cortes de 5 μ m de espessura de cada bloco de tecido foram preparadas. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina, *Luxol fast blue* e corante de neurofilamentos (anticorpo monoclonal de camundongo antiproteína de neurofilamento humano, clone 2F11; Dako, Glostrup, Dinamarca).^{18,19}



Figura 1 Medula espinal. As setas apontam o cateter PU-10 na região dorsal da parte inferior da medula espinal.

Uma avaliação histopatológica foi feita em três áreas: dano neuronal (cromatólise, gliose e neurite); lesão meníngea (inflamação, adesão e fibrose); dano axonal (vacuolização do funículo dorsal e perda de mielina). Semi-quantitativamente, cada área recebeu um escore: 0 (sem dano), 1 (dano moderado < 50%) ou 2 (dano grave > 50%), como sugerido por Kim et al.¹⁷ Os escores foram então totalizados (min = 0 e max = 6). Para evitar viés, as alterações histopatológicas foram analisadas por dois patologistas que desconheciam o estudo.

Análise estatística

Os dados foram analisados com o programa Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0 (IBM SPSS Statistics Inc., IBM Corp., Armonk, NY, EUA). As comparações intra-grupo e intergrupos foram feitas com Anova de variância simples por postos de Kruskal-Wallis e, em seguida, o teste de comparações múltiplas de Dunn. Os parâmetros foram expressos em valores medianos (min-max). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

Entre os grupos, quatro ratos morreram durante o cateterismo do espaço intratecal devido a complicações, como compressão ou lesão medular e hemorragia subaracnoidea.²⁰ Três ratos retiraram o cateter no dia seguinte à cirurgia e foram excluídos.

Os ratos restantes exibiram comportamento normal durante o intervalo de três dias entre a colocação do cateter e a administração do (S)-(+)-cetoprofeno e também ganharam peso normalmente ao longo do estudo.

Avaliação neurofuncional

Após a administração do (S)-(+)-cetoprofeno, todos os ratos responderam normalmente aos testes de pinçamento, com escore zero para cada um dos grupos, e exibiram funções motoras típicas no 3^o, 7^o e 21^o dias, com escore 1 para todos os grupos. Todos os ratos apresentaram respostas evasivas normais (escore 0) nos testes de pinçamento e padrões normais de marcha sem deformidade dos membros posteriores nas avaliações da função motora (escore 1) em todos os momentos (tabela 1). Portanto, os dados dos testes de pinçamento e a avaliação da função motora não foram analisados estatisticamente.

Tabela 1 Testes de pinçamento e avaliações da função motora após injeções intratecais

Dias após a injeção intratecal		Grupos	Mediana (min-max)
3° dia (n = 9)	Escore do teste de pinçamento ^a	Grupo C	0 (0-0)
		Grupo 1	0 (0-0)
		Grupo 2	0 (0-0)
	Escore da avaliação da função motora ^b	Grupo C	1 (1-1)
		Grupo 1	1 (1-1)
		Grupo 2	1 (1-1)
7° dia (n = 9)	Escore do teste de pinçamento	Grupo C	0 (0-0)
		Grupo 1	0 (0-0)
		Grupo 2	0 (0-0)
	Escore da avaliação da função motora	Grupo C	1 (1-1)
		Grupo 1	1 (1-1)
		Grupo 2	1 (1-1)
21° dia (n = 9)	Escore do teste de pinçamento	Grupo C	0 (0-0)
		Grupo 1	0 (0-0)
		Grupo 2	0 (0-0)
	Escore da avaliação da função motora	Grupo C	1 (1-1)
		Grupo 1	1 (1-1)
		Grupo 2	1 (1-1)

Todos os ratos apresentaram respostas normais nos testes de pinçamento e nas avaliações da função motora em todos os momentos avaliados. Portanto, os dados resultantes não foram analisados estatisticamente.

^a Os escores do teste de pinçamento foram classificados em uma escala de quatro pontos da seguinte forma: 0, resposta normal com vocalização forte, retirada reflexiva do membro imediatamente após o pinçamento e morder a pinça dentro de 6 s a partir do momento em que o membro posterior foi pinçado; 1, resposta levemente prejudicada; 2, resposta moderadamente prejudicada e 3, sem resposta. Escores ≥ 1 foram considerados anormais e indicativos de lesões nos nervos motores e sensoriais.

^b Os escores da função motora foram classificados em uma escala de quatro pontos, como a seguir: 1, marcha normal sem parestesia motora; 2, marcha normal com leve irregularidade nos membros posteriores, como flexão plantar dos dedos; 3, marcha levemente desordenada e/ou inversão da pata traseira; 4, posição incorreta do pé com claudicação significativa. Escores ≥ 2 foram considerados indicativos de lesão nos nervos motores.

Grupo C (controle): 20 μ L de água estéril.

Grupo 1: 2,5 μ L da mistura de 100 μ g de (S)-(+)-cetoprofeno + 17,5 μ L de água estéril.

Grupo 2: 800 μ g de (S)-(+)-cetoprofeno (20 μ L da mistura).

Avaliação histopatológica

Não houve incidência de sangramento, necrose ou lesão tecidual no sistema nervoso periférico durante as laminectomias e excisões da medula espinhal. Ambos os grupos com dosagens de 100 μ g e 800 μ g apresentaram escores para as categorias combinadas de dano ao sistema nervoso central significativamente maiores no 3° e 7° dias do que no 21° dia ($p < 0,05$) (tabela 2). Não foram detectadas diferenças intragrupos estatisticamente significativas para inflamação meníngea, dano axonal ou dano neuronal entre os grupos 1 e 2 e também nos controles ao longo do estudo (tabela 3).

As comparações intergrupos entre as dosagens dos grupos não revelaram diferenças estatisticamente significativas para inflamação meníngea, dano axonal ou dano neuronal e os escores totais foram os mesmos no 3° dia (tabela 4). No 7° dia, entretanto, os escores totais foram significativamente maiores no Grupo 2 comparado com o Grupo 1 e o Grupo C ($p = 0,048$). No 21° dia, o escore total foi significativamente menor no Grupo 1 do que no Grupo 2 ou no Grupo C ($p = 0,044$) (tabela 5) (fig. 2A-H).

Discussão

Considerando o potencial do (S)-(+)-cetoprofeno intratecal no tratamento da dor, avaliamos a neurotoxicidade desse fármaco em modelo de rato para estimar sua possível aplicação clínica. O presente estudo mostrou que, embora uma resposta normal tenha sido observada nos testes de pinçamento e de função motora em cada momento de avaliação, houve mais neurotoxicidade em ambos os grupos testados no 3° e 7° dias do que no 21° dia, tanto com a dose baixa quanto com a dose alta de (S)-(+)-cetoprofeno. A neurotoxicidade observada no 7° dia, em termos de inflamação meníngea e dano axonal e neuronal, foi bem maior nos ratos que receberam a dose alta (800 μ g) de (S)-(+)-cetoprofeno do que nos controles ou naqueles que receberam a dose baixa (100 μ g) de (S)-(+)-cetoprofeno, indicou neurotoxicidade dose-dependente.

A estimulação nociceptiva aumenta de modo acentuado a expressão das prostaglandinas espinhais, que aumentam a transmissão do sinal nociceptivo na medula espinhal e causam a sensibilização central.²¹ Os tratamentos intratecais permitem a administração direta de analgésico no líquido

Tabela 2 Comparações intragrupos dos escores totais

	Dias após a injeção intratecal	Mediana (min-max)	p-valor
Grupo C (n = 9)	3° dia	0 (0-1)	0,87
	7° dia	0 (0-1)	
	21° dia	2 (1-2)	
Grupo 1 (n = 9)	3° dia	2 (1-3)	0,044
	7° dia	3 (2-5)	
	21° dia	0 ^a (0-0)	
Grupo 2 (n = 9)	3° dia	2 (2-3)	0,029
	7° dia	5 (3-5)	
	21° dia	0 ^a (0-1)	

^a $p < 0,05$ versus dados correspondentes do 3° e 7° dias.

O escore total foi classificado de 0 a 6 (0 = mínimo, 6 = máximo).

Grupo C (controle): 20 µL de água estéril.

Grupo 1: 2,5 µL da mistura de 100 µg de (S)-(+)-cetoprofeno + 17,5 µL de água estéril.

Grupo 2: 800 µg de (S)-(+)-cetoprofeno (20 µL da mistura).

Tabela 3 Comparações intragrupos dos achados neuropatológicos

	Tipo de lesão	Dias após a injeção intratecal	Mediana (min-max)	p-valor
Grupo C (n = 9)	Meníngea	3° dia	0 (0-1)	0,67
		7° dia	1 (0-1)	
		21° dia	0 (0-1)	
	Axonal	3° dia	1 (0-1)	0,67
		7° dia	1 (0-1)	
		21° dia	1 (0-1)	
	Neuronal	3° dia	0 (0-0)	0,64
		7° dia	1 (0-1)	
		21° dia	1 (0-1)	
Grupo 1 (n = 9)	Meníngea	3° dia	0 (0-0)	0,20
		7° dia	0 (0-2)	
		21° dia	2 (0-2)	
	Axonal	3° dia	1 (0-1)	1
		7° dia	1 (0-2)	
		21° dia	2 (0-2)	
	Neuronal	3° dia	1 (0-1)	1
		7° dia	1 (0-1)	
		21° dia	1 (0-1)	
Grupo 2 (n = 9)	Meníngea	3° dia	0 (0-1)	1
		7° dia	0 (0-1)	
		21° dia	1 (0-1)	
	Axonal	3° dia	0 (0-1)	0,56
		7° dia	0 (0-0)	
		21° dia	0 (0-1)	
	Neuronal	3° dia	0 (0-0)	0,64
		7° dia	0 (0-0)	
		21° dia	0 (0-0)	

O grau de inflamação meníngea, o dano neuronal e o dano axonal foram classificados em uma escala de três pontos como a seguir: 0 = nenhum; 1 = moderado; 2 = grave.

Grupo C (controle): 20 µL de água estéril.

Grupo 1: 2,5 µL da mistura de 100 µg de (S)-(+)-cetoprofeno + 17,5 µL de água estéril.

Grupo 2: 20 µL da mistura de 800 µg de (S)-(+)-cetoprofeno.

Tabela 4 Comparações intergrupos dos achados neuropatológicos

Dias após a injeção intratecal	Tipo de lesão	Grupos	Mediana (min-max)	p-valor
3° dia (n = 9)	Meníngea	Grupo C	0 (0-1)	0,202
		Grupo 1	0 (0-0)	
		Grupo 2	0 (0-1)	
	Axonal	Grupo C	1 (0-1)	0,396
		Grupo 1	1 (0-1)	
		Grupo 2	0 (0-1)	
	Neuronal	Grupo C	0 (0-0)	0,801
		Grupo 1	1 (0-1)	
		Grupo 2	0 (0-0)	
7° dia (n = 9)	Meníngea	Grupo C	1 (0-1)	0,102
		Grupo 1	0 (0-2)	
		Grupo 2	0 (0-1)	
	Axonal	Grupo C	1 (0-1)	0,202
		Grupo 1	1 (0-2)	
		Grupo 2	0 (0-0)	
	Neuronal	Grupo C	1 (0-1)	0,202
		Grupo 1	1 (0-1)	
		Grupo 2	0 (0-0)	
21° dia (n = 9)	Meníngea	Grupo C	0 (0-1)	0,670
		Grupo 1	2 (0-2)	
		Grupo 2	1 (0-1)	
	Axonal	Grupo C	1 (0-1)	0,396
		Grupo 1	2 (0-2)	
		Grupo 2	0 (0-1)	
	Neuronal	Grupo C	1 (0-1)	0,211
		Grupo 1	1 (0-1)	
		Grupo 2	0 (0-0)	

O grau de inflamação meníngea, o dano neuronal e o dano axonal foram classificados em uma escala de três pontos como a seguir: 0 = nenhum; 1 = moderado; 2 = grave.

Grupo C (controle): 20 µL de água estéril.

Grupo 1: 2,5 µL da mistura de 100 µg de (S)-(+)-cetoprofeno + 17,5 µL de água estéril.

Grupo 2: 20 µL da mistura de 800 µg de (S)-(+)-cetoprofeno.

Tabela 5 Comparações intergrupos dos escores totais

Dias após a injeção intratecal		Grupos	Mediana (min-max)	p-valor
3º dia (n = 9)	Escore total	Grupo C	0 (0-1)	0,72
		Grupo 1	2 (1-3)	
		Grupo 2	2 (2-3)	
		[0,1-5]		
7º dia (n = 9)	Escore total	Grupo C	0 (0-1)	0,048
		Grupo 1	3 (2-5)	
		Grupo 2	5 ^a (3-5)	
21º dia (n = 9)	Escore total	Grupo C	1 (0-1)	0,044
		Grupo 1	0 ^b (0-0)	
		Grupo 2	0 (0-1)	

^a $p < 0,05$ vs. dados correspondentes do Grupo C e Grupo 1.

^b $p < 0,05$ vs. dados correspondentes do Grupo C e Grupo 2.

O escore total foi classificado de 0 a 6 (0 = mínimo, 6 = máximo).

Grupo C (controle): 20 µL de água estéril.

Grupo 1: 2,5 µL da mistura de 100 µg de (S)-(+)-cetoprofeno + 17,5 µL de água estéril.

Grupo 2: 20 µL da mistura de 800 µg de (S)-(+)-cetoprofeno.

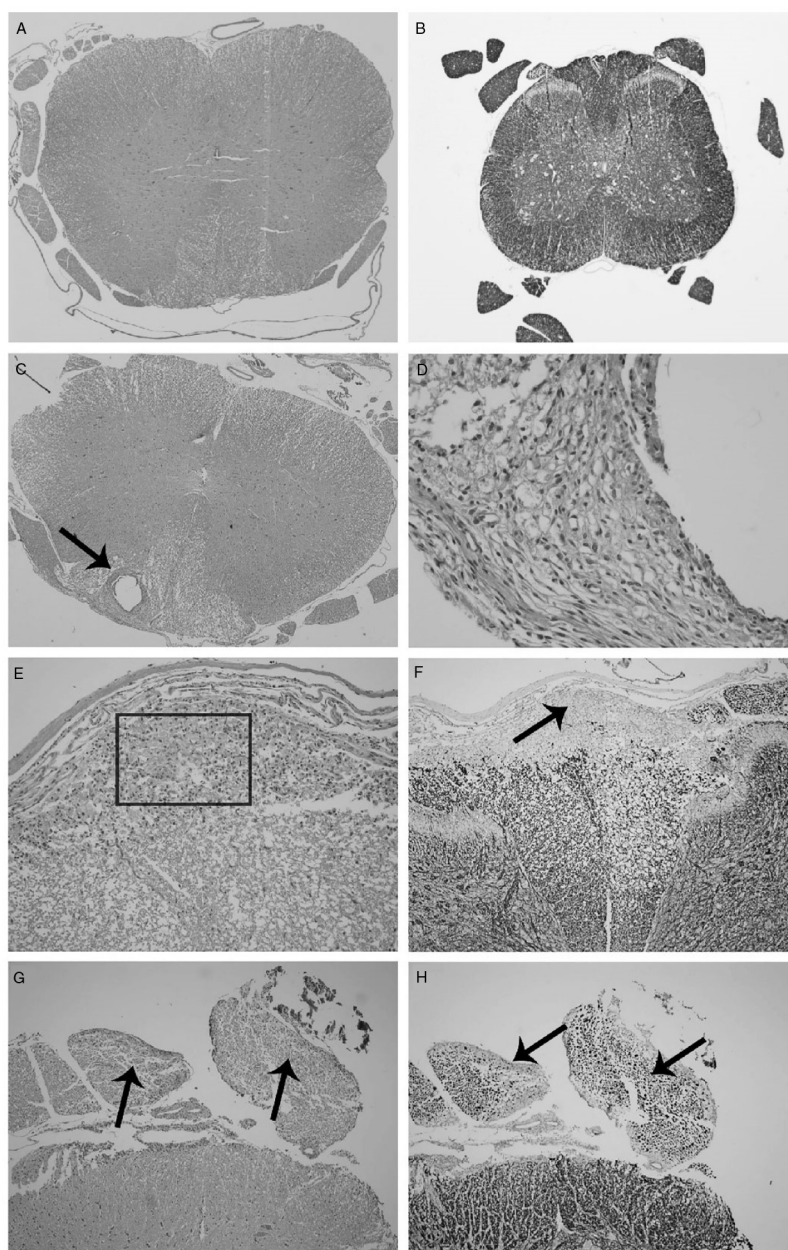


Figura 2 A–H Achados micrográficos leves nas medulas espinais dos ratos após administração subaracnoidea de 100 μ g (Grupo 1) e 800 μ g (Grupo 2) de (S)-(+)-cetoprofeno. (A) Grupo C (3° dia): medula espinal com histomorfologia normal, coloração de hematoxilina e eosina, ampliação original 40 $\times$. (B) Coloração imuno-histoquímica com coloração de neurofilamentos, 40 $\times$. (C) Grupo 1 (7° dia): Inflamação histiocítica e formação cística no funículo dorsal da medula espinal (seta), coloração de hematoxilina e eosina, ampliação original 40 $\times$. (D) Um exame mais detalhado da seção em (A) revela que a inflamação consiste em histiócitos, eosinófilos e neutrófilos, coloração de hematoxilina e eosina, 400 $\times$. (E) Grupo 2 (7° dia): Inflamação na região dorsal da medula espinal (quadrado), coloração de hematoxilina e eosina, 200 $\times$. (F) Grupo 2 (7° dia): Estudo imuno-histoquímico com proteína de neurofilamento que demonstra áreas inflamatórias não coradas na região dorsal (seta), coloração imuno-histoquímica com coloração de neurofilamento, 100 $\times$. (G) Grupo 2 (7° dia): vacuolização axonal (setas), hematoxilina e eosina, 100 $\times$. (H) Grupo 2 (7° dia): degeneração axonal e diminuição da mielina (setas), coloração imuno-histoquímica com coloração de neurofilamento, 100 $\times$.

cefalorraquidiano (LCR), contornam a barreira hematoencefálica e proporcionam efeitos analgésicos superiores.²² Dessa forma, os inibidores da ciclo-oxigenase administrados por via intratecal reduzem fortemente a hipersensibilidade, comparados com as injeções periféricas de formalina, e

suprimem a hipersensibilidade tardia aos estímulos mecânicos após a exposição ao fentanil.^{5,23}

Enquanto alguns AINEs, como indometacina, acemetacina, tolmetina, etodolaco, ceterolaco e oxaprozina, conseguem ativar vários mecanismos neuroprotetores,

inclusive a inibição da síntese de prostaglandinas inflamatórias, outros AINEs, como diclofenaco e celecoxibe, não produzem esse efeito neuroprotetor e podem até apresentar efeitos neurotóxicos no sistema nervoso central.²⁴

A dependendo da dose, a aplicação intratecal de AINEs pode lesionar a medula espinhal e as raízes nervosas.^{25,26} O dano está relacionado à concentração e ao tempo de exposição do fármaco e, provavelmente, inclui a redução dos efeitos antioxidantes, a paralisação do ciclo celular, o aumento do acúmulo intracelular de toxinas, a inibição da resistência a múltiplos fármacos, o aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e o aumento de apoptose.²⁴ A dor e a perda da função motora e da sensação são os resultados de gliose, inflamação e dano à bainha de mielina e outros danos neuronais.²⁵

Os efeitos neurotóxicos de fármacos administrados por via intratecal dependem do tipo de fármaco e da dose administrada e os efeitos podem ser mais sutis e nem sempre evidentes na dor física ou nos testes de função motora. Canduz et al.²⁷ demonstraram efeitos neurotóxicos causados por três diferentes doses de lornoxicam administradas via cateter peridural. Yaksh et al.²⁶ administraram infusões de cetorolaco a cães via cateter intratecal por 28 dias e injeções intratecais de cetorolaco a ratos quatro vezes ao dia por seis dias e não encontraram sinais de toxicidade na medula espinhal ou nas raízes nervosas. Guevara-López et al.¹⁸ infundiram indometacina em porquinhos-da-índia via cateter intratecal por 14 dias e não conseguiram detectar neurotoxicidade na medula espinhal.

No presente estudo, avaliamos tanto a medula espinhal quanto as raízes nervosas e descobrimos que a neurotoxicidade ocorreu de forma dose-dependente com (S)-(+)-cetoprofeno. Ossipov et al.²⁸ relataram que uma dose de 100 µg de (S)-(+)-cetoprofeno intratecal demonstrou 50% de efeito antinociceptivo em um teste de formalina. Portanto, no presente estudo, usamos 100 µg em uma das doses. Como a dose máxima de (S)-(+)-cetoprofeno solúvel em água é 40,76 mg.mL⁻¹,²⁹ a outra dose usada neste estudo foi 800 µg. A dose parenteral máxima recomendada de (S)-(+)-cetoprofeno (como dexcetoprofeno trometamol) para seres humanos adultos é 150 mg.d⁻¹.³⁰ Doses intratecais de 100 µg e 800 µg de (S)-(+)-cetoprofeno em ratos equivalem a doses parenterais de 2,800 mg e 22,400 mg, respectivamente, em seres humanos adultos. A dose recomendada de AINE para administração intratecal é de aproximadamente 1/100 da dose necessária para a administração parenteral.¹⁹

Kim et al.¹⁹ relataram que uma única dose de parecoxib, um inibidor da ciclooxigenase-2, não demonstrou efeitos neurotóxicos. No entanto, o estudo não incluiu um exame histopatológico das raízes nervosas e apenas a medula espinhal foi avaliada. Estudos prévios com animais indicam que drogas intratecais causam neurotoxicidade em diferentes regiões. Por exemplo, lesões neurotóxicas induzidas por algumas drogas intratecais são observadas principalmente nas raízes nervosas. Esse é particularmente o caso dos anestésicos locais, porque seu principal local de ação é o neurônio dos gânglios da raiz dorsal.^{31,32} Alterações neurotóxicas induzidas por outras drogas intratecais, inclusive fentanil e diclofenaco, também ocorrem na medula espinhal.^{33,34} Portanto, neste estudo, exames histopatológicos da medula espinhal e das raízes nervosas foram feitos.

Neste estudo, não houve associação aparente entre lesão neurológica e perda motora ou sensorial, como observado no teste de pinçamento ou durante a avaliação da função motora. No entanto, o escore de dano histopatológico, determinado pelos escores totais para as categorias combinadas de dano, foi maior no 3º e 7º dias do que no 21º dia, o que foi interpretado como uma lesão tecidual aguda causada por (S)-(+)-cetoprofeno sanada com o tempo. O aumento dose-dependente do dano sugeriu que houve um efeito tóxico relacionado à dose. Embora não tenha havido déficits excepcionais na função motora e sensorial, o dano histopatológico foi óbvio, indicou um possível nível baixo de neurotoxicidade, o que pode ser a causa dos escores muito baixos (0 ou 1) para inflamação da meníngea e lesão neuronal e axonal ao longo do estudo.

A limitação mais importante do nosso estudo foi a incapacidade de avaliar a distribuição do (S)-(+)-cetoprofeno no líquido cefalorraquidiano. Informações adicionais podem ser obtidas mediante a avaliação das estruturas neuronais com um microscópio eletrônico.

Sumário

A administração intratecal de (S)-(+)-cetoprofeno causou alterações neuro-histopatológicas dose-dependentes em ratos. Essas alterações foram evidentes no 3º e 7º dias, mas declinaram no 21º dia. Embora a presença de lesões neuronais não tenha apresentado correlação com sintomas neurológicos, é impossível concluir que o fármaco não seja neurotóxico. Portanto, a administração intratecal de (S)-(+)-cetoprofeno não pode ser recomendada para uso em animais e humanos.

Financiamento

Presidência da Comissão de Projetos de Pesquisas Científicas da Universidade Ondokuz Mayis, Samsun, Turquia; número do projeto PYO.TIP.1901.13.03.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

A Fatih Ilkaya, M.D., da Universidade Ondokuz Mayis, Departamento de Farmacologia, e a Hasan Guzel, M.D., da Universidade Ondokuz Mayis, Departamento de Farmacologia, por sua assistência na coleta de dados. Também agradecemos a Ali Haydar Sahinoglu, MD, da Universidade Ondokuz Mayis, Departamento de Anestesiologia, pelos comentários que melhoraram muito o manuscrito.

Referências

1. Ceyhan D, Gulec MS. Is postoperative pain only a nociceptive pain? *Agri*. 2010;22:47–52.
2. Gan TJ, Habib AS, Miller TE, et al. Incidence, patient satisfaction, and perceptions of post-surgical pain: results from a US national survey. *Curr Med Res Opin*. 2014;30:149–60.

3. Chou R, Gordon DB, de Leon-Casasola OA, et al. Management of postoperative pain: a clinical practice guideline from the American Pain Society, the American Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine, and the American Society of Anesthesiologists' Committee on Regional Anesthesia, Executive Committee, and Administrative Council. *J Pain*. 2016;17:131–57.
4. Yucel E, Kol IO, Duger C, et al. Ilioinguinal-iliohypogastric nerve block with intravenous dexketoprofen improves postoperative analgesia in abdominal hysterectomies. *Rev Bras Anesthesiol*. 2013;63:334–9.
5. Malmberg AB, Yaksh TL. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;263:136–46.
6. Zhu X, Conklin D, Eisenach JC. Cyclooxygenase-1 in the spinal cord plays an important role in postoperative pain. *Pain*. 2003;104:15–23.
7. Mauleon D, Artigas R, Garcia ML, et al. Preclinical and clinical development of dexketoprofen. *Drugs*. 1996;52 Suppl 5:24–46.
8. Barbanoj MJ, Antonijoan RM, Gich I. Clinical pharmacokinetics of dexketoprofen. *Clin Pharmacokinet*. 2001;40:245–62.
9. Eisenach JC, Curry R, Tong C, et al. Effects of intrathecal ketorolac on human experimental pain. *Anesthesiology*. 2010;112:1216–24.
10. Eisenach JC, Curry R, Hood DD, et al. Phase I safety assessment of intrathecal ketorolac. *Pain*. 2002;99:599–604.
11. Eisenach JC, Curry R, Rauck R, et al. Role of spinal cyclooxygenase in human postoperative and chronic pain. *Anesthesiology*. 2010;112:1225–33.
12. Mazario J, Gaitan G, Herrero JF. Cyclooxygenase-1 vs. cyclooxygenase-2 inhibitors in the induction of antinociception in rodent withdrawal reflexes. *Neuropharmacology*. 2001;40:937–46.
13. Cabre F, Fernandez MF, Calvo L, et al. Analgesic, antiinflammatory, and antipyretic effects of S(+)-Ketoprofen in vivo. *J Clin Pharmacol*. 1998;38:35–105.
14. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav*. 1976;17:1031–6.
15. Korkmaz HA, Maltepe F, Erbayraktar S, et al. Antinociceptive and neurotoxicologic screening of chronic intrathecal administration of ketorolac tromethamine in the rat. *Anesth Analg*. 2004;98:148–52.
16. Bajrovic F, Sketelj J. Extent of nociceptive dermatomes in adult rats is not primarily maintained by axonal competition. *Exp Neurol*. 1998;150:115–21.
17. Chatani K, Kawakami M, Weinstein JN, et al. Characterization of thermal hyperalgesia, c-fos expression, and alterations in neuropeptides after mechanical irritation of the dorsal root ganglion. *Spine*. 1995;20:277–90.
18. Guevara-Lopez U, Covarrubias-Gomez A, Gutierrez-Acar H, et al. Chronic subarachnoid administration of 1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indole-3 acetic acid (indomethacin): an evaluation of its neurotoxic effects in an animal model. *Anesth Analg*. 2006;103: 99–102.
19. Kim YH, Lee PB, Park J, et al. The neurological safety of epidural parecoxib in rats. *Neurotoxicology*. 2011;32:864–70.
20. Hou Y, Wang L, Gao J, et al. A modified procedure for lumbar intrathecal catheterization in rats. *Neurol Res*. 2016;38:725–32.
21. Chen L, Yang G, Grosser T. Prostanoids and inflammatory pain. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2013;104–105:58–66.
22. Dodou K. Intrathecal route of drug delivery can save lives or improve quality of life. *Pharm J*. 2012;289:501.
23. Kang YJ, Vincler M, Li X, et al. Intrathecal ketorolac reverses hypersensitivity following acute fentanyl exposure. *Anesthesiology*. 2002;97:1641–4.
24. Aygun D, Kaplan S, Odaci E, et al. Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review of melatonin and diclofenac sodium association. *Histol Histopathol*. 2012;27: 417–36.
25. Hodgson PS, Neal JM, Pollock JE, et al. The neurotoxicity of drugs given intrathecally (spinal). *Anesth Analg*. 1999;88:797–809.
26. Yaksh TL, Horais KA, Tozier N, et al. Intrathecal ketorolac in dogs and rats. *Toxicol Sci*. 2004;80:322–34.
27. Canduz B, Aktug H, Mavioglu O, et al. Epidural lornoxicam administration – innocent. *J Clin Neurosci*. 2007;14:968–74.
28. Ossipov MH, Jerussi TP, Ren K, et al. Differential effects of spinal (R)-Ketoprofen and (S)-Ketoprofen against signs of neuropathic pain and tonic nociception: evidence for a novel mechanism of action of (R)-ketoprofen against tactile allodynia. *Pain*. 2000;87:193–9.
29. Shohin IE, Kulinich JI, Ramenskaya GV, et al. Evaluation of in vitro equivalence for drugs containing BCS class II compound ketoprofen. *Dissolut Technol*. 2011;18:26–9.
30. Rodriguez MJ, Arbos RM, Amaro SR. Dexketoprofen trometamol: clinical evidence supporting its role as a painkiller. *Expert Rev Neurother*. 2008;8:1625–40.
31. Takenami T, Yagishita S, Murase S, et al. Neurotoxicity of intrathecally administered bupivacaine involves the posterior roots/posterior white matter and is milder than lidocaine in rats. *Reg Anesth Pain Med*. 2005;30:464–72.
32. Doan LV, Eydlin O, Piskoun B, et al. Despite differences in cytosolic calcium regulation, lidocaine toxicity is similar in adult and neonatal rat dorsal root ganglia in vitro. *Anesthesiology*. 2014;120:50–61.
33. Abut YC, Turkmen AZ, Midi A, et al. Neurotoxic effects of levobupivacaine and fentanyl on rat spinal cord. *Rev Bras Anesthesiol*. 2015;65:27–33.
34. Ozdogan L, Ayerden T, Ornek D, et al. The neurotoxic effect of intrathecal diclofenac sodium in rats. *Kafkas Univ Vet Fak*. 2011;17:309–14.