

Análise do Potencial Citotóxico Agudo da Bupivacaína e Bupivacaína em Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) Incorporadas a Microesferas sobre o Nervo Ciático de Ratos

Pedro Paulo Tanaka¹, Maria Fernanda Torres², Sergio Bernardo Tenorio³

Resumo: Tanaka PP, Torres MF, Tenorio SB – Análise do Potencial Citotóxico Agudo da Bupivacaína e Bupivacaína em Excesso Enantiomérico de 50% (S75-R25) Incorporadas a Microesferas sobre o Nervo Ciático de Ratos.

Justificativa e objetivos: A duração do efeito dos anestésicos locais (AL) pode ser ampliada pela sua incorporação aos sistemas de liberação prolongada como microesferas. No entanto, a possibilidade de que os sistemas de liberação prolongada de AL sejam neurotóxicos não tem recebido a devida atenção na literatura. Este estudo teve o objetivo de investigar os efeitos de microesferas de ácido polilático-co-glicólico puras, preenchidas com bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% ou com bupivacaína (BP), assim como os efeitos da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% em nervo ciático de ratos Wistar.

Método: Os ratos foram alocados em quatro grupos de acordo com o tempo de avaliação (dois, quatro, seis e oito dias) e denominados conforme a solução injetada sobre o nervo ciático: microesferas com bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (MBE), microesferas com bupivacaína (MB); microesferas puras (MP) e bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (BE).

Resultados: Nos cortes histológicos semifinos observou-se distribuição regular homogênea nas fibras de colágeno no endoneuro e nenhuma alteração degenerativa dos axônios ou das bainhas de mielina foi constatada. Nos cortes ultrafinos foram observados axônios mielinizados e fibras de Remak de aspecto normal com axoplasma apresentando distribuição homogênea de neurofilamentos e microtúbulos. A análise histomorfométrica dos axônios não revelou diferença significativa entre os diâmetros dos axônios dos grupos estudados.

Unitermos: ANESTÉSICOS, Local, bupivacaína, bupivacaína (S75-R25), toxicidade; ANIMAL, Rato.

©2012 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

INTRODUÇÃO

A administração de anestésico local (AL) diretamente sobre nervos ou troncos nervosos para bloquear a percepção da dor pelo paciente é uma técnica eficaz. Os mecanismos fisiológicos da neurotoxicidade causada pelos AL foram relacionados à inibição do transporte axonal, desestabilização do citoesqueleto axonal, degeneração axonal e isquemia neural¹. No entanto, poucos estudos descreveram o mecanismo responsável pela injúria e se a injúria é causada direta ou indiretamente pelo AL.

Alguns autores² comprovaram que concentrações maiores de lidocaína e bupivacaína (BP) promovem bloqueio mais

duradouro em nervos ciáticos de ratos, no entanto, são claramente neurotóxicas sob análise histopatológica. Esses resultados sugerem a existência de uma relação entre tempo prolongado de anestesia e lesão neurotóxica.

Estudos investigaram a farmacodinâmica e farmacocinética da intoxicação aguda provocada por ALs e, apesar de existirem relatos na literatura sobre neurotoxicidade¹, não existem estudos experimentais *in vivo* sobre o uso de microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (S75-R25), bem como da avaliação morfológica dos efeitos neurotóxicos desse anestésico por microscopia óptica (MO) ou eletrônica (ME).

Este estudo teve o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos das microesferas de ácido polilático-co-glicólico puras em nervo ciático de ratos Wistar, preenchidas com bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) e com BP, assim como da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (S75-R25).

MÉTODOS

A população da pesquisa foi constituída por 16 ratos Wistar machos com, aproximadamente, três meses de idade e 300 g de peso médio, provenientes do Biotério da Universidade Positivo. Durante todo o período de experimentação, os animais foram mantidos em sala climatizada (temperatura média de

Recebido da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Brasil.

1. Doutor; Professor associado, Universidade Federal do Paraná (UFPR)

2. Professora Adjunta, UFPR

3. Professor Adjunto, Disciplina Anestesiologia, UFPR; Chefe do Serviço de Anestesiologia da UFPR

Submetido em 22 de maio de 2011.

Aprovado para publicação em 19 de junho de 2011.

Correspondência para:

Dra. Maria Fernanda Torres

Rua Venezuela, 54

Bacacheri

82510100 – Curitiba, PR, Brasil

E-mail: mariafernandatorres@gmail.com

22°C) com fotoperíodo de 12 horas, livre acesso à água e à ração. O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Positivo.

Os experimentos foram realizados em ambiente tranquilo e conduzidos por um mesmo pesquisador que desconhecia a droga injetada. Os ratos foram separados em quatro grupos de quatro animais denominados de acordo com a solução injetada sobre o nervo ciático em: microesferas com bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (MBE), microesferas com bupivacaína (MB); microesferas puras (MP), e bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (BE).

Após a anestesia dos ratos pela vaporização de halotano entre 2% a 4% em oxigênio por máscara facial, foi possível a manipulação para injeção da solução diretamente sobre o nervo ciático.

Após o 2º, 4º, 6º e 8º dias da aplicação das soluções, os animais foram eutanasiados por injeção intraperitoneal de Tiopental 2,5% e, em seguida, a extremidade proximal do nervo ciático foi dissecada e fixada em solução de glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,4 M e encaminhada para processamento no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

A avaliação do potencial neurotóxico da droga foi feita em MO e ME de transmissão (MET) investigando-se: desmielinização, degeneração axonal e sinais de inflamação evidenciados por infiltração de células inflamatórias.

Os cortes semifinos (0,5 µm) foram corados pelo azul de toluidina e os campos que apresentaram boa qualidade de imagem foram fotografados e submetidos à histomorfometria pela aplicação do programa *Image Pro Plus* versão 4,5. Realizou-se a medição do diâmetro de 10 axônios por campo fotografado totalizando o registro do diâmetro de 100 axônios por nervo.

Os cortes ultrafinos (70 nm) foram corados com Uranila a 2% e solução de Reynolds para posterior análise no microscópio JEOL JEM – 1.200 EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

Os resultados obtidos pela histomorfometria dos nervos ciáticos foram comparados dois a dois por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância considerado foi de 0,05, sendo corrigido por Bonferroni. Em função de serem efetuadas seis comparações dos grupos dois a dois, serão consideradas diferenças significativas aquelas para os quais o valor de p for menor que 0,008.

RESULTADOS

Este estudo apresenta uma análise sistemática dos efeitos toxicológicos sobre o sistema nervoso periférico entre os grupos estudados entre as soluções aplicadas sobre nervo ciático de ratos Wistar. Utilizou-se a MET para a análise ultraestrutural de nervo ciático de ratos Wistar em busca de evidências sobre o efeito neurotóxico desses AL e das próprias microesferas. Aliada à análise ultraestrutural foi realizada histomorfometria sob microscopia de luz em busca de

diferenças entre os diâmetros dos axônios que pudessem ser interpretadas como alteração neurotoxicológica.

Nos cortes semifinos de todos os grupos e em todos os tempos estudados (2, 4, 6 e 8 dias), ilustrados na Figura 1, são observadas fibras de aspecto normal dentro dos fascículos. Pode-se ver axônios com diâmetro pequeno, com uma bainha de mielina fina, e axônios maiores com bainha de mielina espessa. Há uma distribuição regular homogênea nas fibras de colágeno no endoneuro. Não são observadas alterações degenerativas dos axônios ou das bainhas de mielina. Em vários cortes semifinos foram observados mastócitos. Não foram observadas células inflamatórias no endoneuro ou no perineuro. O aspecto desorganizado de algumas bainhas de mielina é interpretado como artefato de processamento.

Nos cortes ultrafinos em todos os grupos de todos os tempos (2, 4, 6 e 8 dias), ilustrados na Figura 2, são observados axônios mielinizados de aspecto normal e axônios não mielinizados envolvidos por células de Schwann em estruturas designadas como fibras de Remak. O axoplasma contém uma distribuição homogênea de neurofilamentos e microtúbulos com ocasionais mitocôndrias. Em alguns cortes, são visualizados núcleos das células de Schwann associadas com o internodo de mielina e com as fibras de Remak. É constatada a presença de fibroblastos e mastócitos no endoneuro. Em todos os cortes examinados, são conspícuas as fibras de colágeno em contato com a membrana basal das células de Schwann.

Os cortes semifinos dos nervos ciáticos de cada rato foram fotografados e submetidos à análise histomorfométrica com auxílio do programa *Image Pro Plus* versão 4,5. Em cada nervo ciático foram registrados os diâmetros de 100 axônios, considerando-se como critério de seleção do axônio a coloração e o posicionamento central dos axônios no campo fotografado. Para a análise estatística, foi considerada a média das 100 medidas obtidas em cada rato.

Testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos dois grupos sob comparação, *versus* a hipótese alternativa de resultados diferentes. A Tabela I apresenta os diâmetros mínimo, máximo e médio dos axônios, considerando as 100 medições para cada um dos ratos. Nota-se que um dos ratos do grupo M apresentou a menor média do grupo. Observa-se também que o grupo M apresentou uma maior dispersão dos resultados.

Tabela I – Estatística Descritiva do Diâmetro Médio das 100 Medições dos Axônios do Nervo Ciático dos Ratos dos Diferentes Grupos

Grupo	n	Diâmetro (µm)				DP
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo	
MBE	4	4,63	4,62	4,26	5,02	0,31
BE	4	5,33	5,21	5,00	5,91	0,42
MB	4	4,56	4,69	3,71	5,15	0,61
MP	3	3,96	4,56	1,90	4,83	1,39

MBE: ratos que receberam injeção extraneural de microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (S75-R25); BE: ratos que receberam injeção extraneural de (S75-R25) livre; MB: ratos que receberam injeção extraneural de microesferas de BP; MP: ratos que receberam injeção extraneural de microesferas puras; n: número de ratos por grupo; µm: micrômetros.

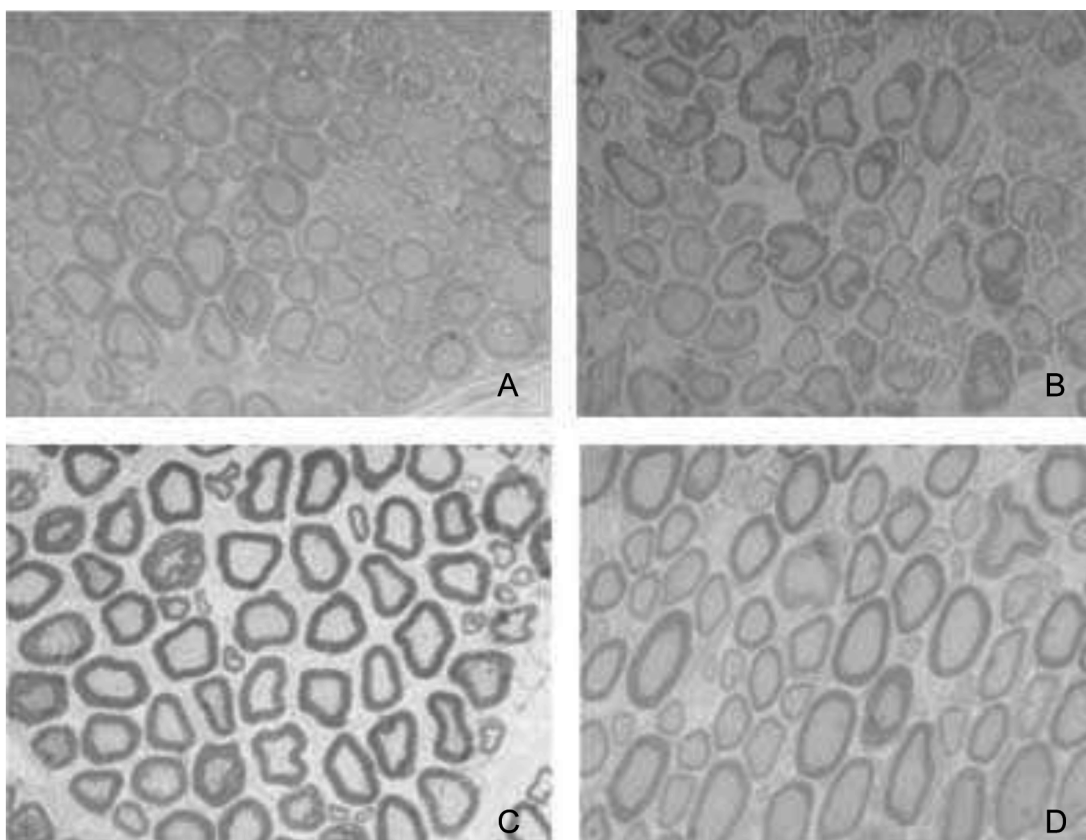


Figura 1 – Cortes Semifinos dos Nervos Bloqueados com Microesferas Contendo Bupivacaína em Excesso Enantiomérico de 50%. Observam-se nas fotografias as características morfológicas normais dos axônios nessa magnificação. Os axônios estão seccionados transversalmente e obliquamente. As alterações observadas em algumas bainhas de mielina são consistentes com artefatos de processamento. A: Rato 30, 2º dia PO; B: Rato 4, 4º dia PO; C: Rato 11, 6º dia PO; D: Rato 23, 8º dia PO. Coloração: azul de toluidina. Objetiva 100X.

Na Tabela II são apresentados os valores de p das comparações dos grupos dois a dois. Testou-se a hipótese nula de resultados iguais nos dois grupos sob comparação, *versus* a hipótese alternativa de resultados diferentes.

Tabela II – Valores de p nas Comparações dos Grupos dois a dois

Grupos sob comparação	Valor de p*
MBE x BE	0,057
MBE x MB	0,886
MBE x MP	0,886
BE x MB	0,114
BE x MP	0,029
MB x MP	0,686

MBE: ratos que receberam injeção extraneural de microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (S75 – R25); BE: ratos que receberam injeção extraneural de (S75 – R25) livre; MB: ratos que receberam injeção extraneural de microesferas de BP; MP: ratos que receberam injeção extraneural de microesferas puras.

*Teste não paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,008$.

DISCUSSÃO

A toxicidade da BP para os sistemas nervoso central e cardiovascular levou à pesquisa de novos ALs com perfil semelhante de bloqueio e menos tóxicos, surgindo novas preparações como a bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%. Em estudo sobre a avaliação da eficácia do bloqueio de nervo ciático de camundongos³, a mistura enantiomérica de BP (S75-R25) foi considerada como uma alternativa para o desenvolvimento de formulações de liberação controlada mais seguras e eficazes do que a BP (S50-R50).

Pesquisas com formulações de AL de liberação controlada têm mostrado resultados promissores. Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento dessas formulações, ainda são necessários estudos para a avaliação da neurotoxicidade local de forma a garantir sua utilização segura na rotina clínica⁴.

O uso de um número pequeno de animais ($n = 16$) deve-se a vários fatores: por um lado as limitações decorrentes das novas diretrizes de bem-estar animal e, por outro, as limitações financeiras que um estudo com a metodologia desenvolvida exige.

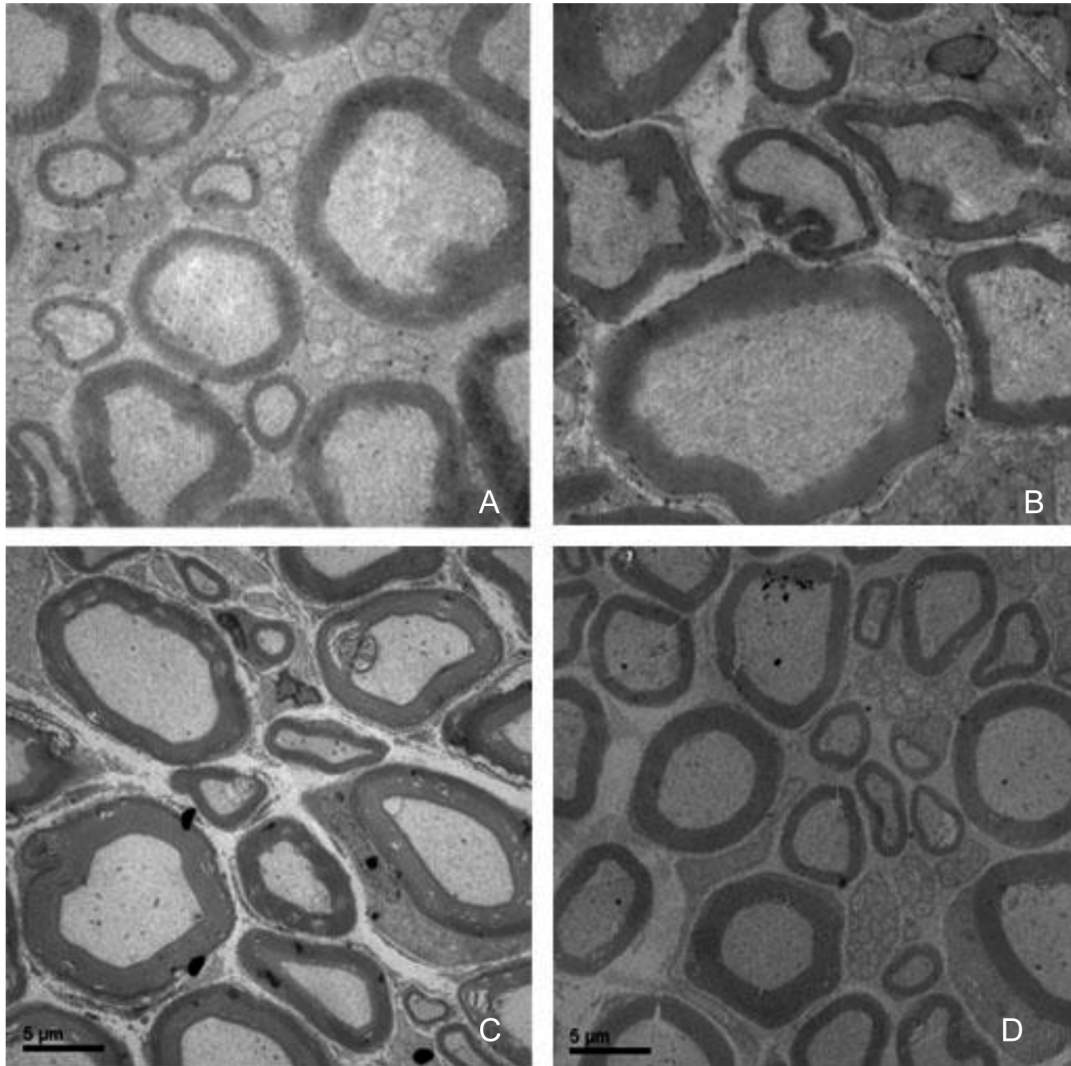


Figura 2 – Ultramicrografias Eletrônicas dos Nervos Ciáticos Anestesiados com Microesferas Contendo Bupivacaína em Excesso Enantiomérico de 50%.

NOTA: São observados axônios mielinizados e fibras de Remak (*) e em uma delas é visualizado o núcleo da célula de Schwann (N). Entre as fibras nervosas, observam-se feixes de colágeno. Algumas das bainhas de mielina apresentam deformação das lamelas decorrentes de artefatos de processamento. No interior dos axônios são observados microtúbulos e neurofilamentos com distribuição homogênea. A: Rato 2, 2º dia PO. B: Rato 9, 4º dia PO. C: Rato 14, 6º dia PO. D: Rato 31, 8º dia PO.

O nervo ciático é o ponto de partida para o estudo *in vivo* de AL compondo com as investigações *in vitro* os requisitos da fase pré-clínica de novos compostos, antes das fases de investigação no ser humano ⁵. O nervo ciático de rato é um modelo experimental mamífero bem-estabelecido para pesquisas sobre toxicologia de nervo periférico ⁶.

A metodologia da injeção foi adequada porque, após a recuperação da capacidade proprioceptiva do membro anestesiado, os animais não mostraram sequelas motoras ou sensoriais. Objetivos estes que fizeram parte de estudo realizado em paralelo no mesmo grupo de animais ⁷.

É imperativo que uma droga seja testada para neurotoxicidade periférica empregando-se técnicas neuropatológicas estabelecidas com maiores sensibilidade e resolução que as preparações de parafina coradas com hematoxilina e eosina.

Embora seja útil para a avaliação de alterações histológicas mais evidentes, a MO pode ocultar alterações recentes entre os axônios, células de Schwann e mielina que indiquem mecanismos neurotóxicos ⁸.

A comprovação de alterações estruturais induzidas por drogas depende da análise ultraestrutural. A escolha do estudo por análise de cortes semifinos e ultrafinos pode ser considerada a mais apropriada, pois muitas vezes, as alterações clínicas não correspondem com as alterações histológicas, ou são muito tênues, portanto, somente o estudo ultraestrutural permite observar lesões discretas ⁹⁻¹⁰.

Tendo em vista a necessidade de uma análise criteriosa em busca de lesão axonal e desmielinização, o presente estudo apresenta a avaliação da ultraestrutura de nervos ciáticos.

A microscopia eletrônica foi indicada como um teste mais sensível capaz de diferenciar lesões neurotóxicas ultraestruturais². Ao avaliar os efeitos neurotóxicos de seis formulações lipídicas de depósito diferentes constituídas por uma mistura de BP e lidocaína sobre nervo ciático de ratos, observou-se, através de MO, tumefação axonal, degeneração neuronal e desmielinização em nervos anestesiados com 64% de BP e lidocaína na proporção de 4:1. Apesar desses achados, concluiu-se que a BP pode ser usada como composto ativo de formulações de depósito e sugeriu-se que o seu potencial neurotóxico deve ser avaliado por testes mais sensíveis, tal como a MET.

Em nenhuma das amostras deste estudo apresentou sinal de neurotoxicidade quando analisadas tanto por MO quanto por ME.

O processo patológico indicativo de neurotoxicidade mais mencionado na literatura é a degeneração walleriana que foi descrita pela primeira vez por Augustus Waller em 1850. É um processo complexo desencadeado por uma injúria ao axônio e resulta na degeneração do axônio e das suas células de suporte, conjunto conhecido como fibra nervosa. Inicialmente, ocorre agrupamento de organelas e outras estruturas do axoplasma, evoluindo o edema do axônio e desintegração. A mielina se desintegra e, depois, é fagocitada pelas células de Schwann e por macrófagos que são recrutados em grande número, em resposta ao aumento do fator de necrose tumoral e de proteínas pró-inflamatórias⁸.

Um aumento da permeabilidade da barreira hematoneural provocados pelos ALs pode aumentar a osmolaridade do fluido intersticial, levando à redução do tamanho dos axônios ou à alteração dos gradientes de concentração dos íons inorgânicos e, conseqüentemente, à diminuição da condução nervosa¹.

Neste estudo, foi considerada a hipótese de que a presença das microesferas e a liberação lenta do AL causariam alteração da permeabilidade dos vasos sanguíneos locais, tornando-os mais permeáveis e permitindo o extravasamento de proteínas osmoticamente ativas que normalmente não são encontradas próximas ao endoneuro e que poderiam atrair água e limitar, dessa forma, o espaço dos axônios e células endoneurais. Nas imagens de ME, contudo, não foi vista distensão do espaço interaxonal e intercelular no endoneuro, que caracterizaria o extravasamento de plasma.

Alguns autores¹¹ implantaram matriz com microesferas no tecido subcutâneo de ratos Wistar e observaram que as microesferas começaram a se degradar 15 dias após a aplicação do implante. No entanto, no presente estudo, nenhuma microesfera foi observada sobre os nervos ciáticos estudados, indicando que as microesferas depositadas já estavam degradadas dois dias após a sua aplicação. Uma razão para essa discordância reside na matriz utilizada na produção das microesferas.

Ao contrário da instabilidade da bainha de mielina demonstrada através de ME e raio-X por Mateu e col.¹² após a aplicação de tetracaína sobre nervo óptico e ciático isolado de ratos, neste estudo não foram evidenciadas alterações nas células de Schwann, que incluem: vacuolização e desintegra-

ção citoplasmáticas e acúmulo de gotículas de gordura no citoplasma indicativas de interrupção do metabolismo lipídico.

A possibilidade de reação inflamatória causada por procedimento cirúrgico foi afastada deste estudo considerando que a aplicação das microesferas e da bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% foi por injeção transcutânea.

Nenhuma alteração estrutural foi observada no presente estudo após a aplicação extraneural de microesferas contendo BP e BP em excesso enantiomérico de 50%. Em outro estudo¹³ também não foram encontradas anormalidades na investigação dos efeitos neurotóxicos da amitriptilina e da BP em nervo ciático de rato. As amostras que foram retiradas após 1, 3, 5 e 7 dias da aplicação das drogas foram analisadas sob MO e apresentavam epineuro e endoneuro intactos, fibras nervosas organizadas, poucas células inflamatórias e insignificante degeneração walleriana.

Os ALs empregados no presente estudo, livres ou incorporados às microesferas, bem como as próprias microesferas, não induziram alterações histológicas ou ultraestruturais nos nervos ciáticos avaliados. Nas imagens obtidas, as estruturas nervosas (fibras, células e espaço extracelular) não mostraram alterações: os axônios apresentaram distribuição homogênea de componentes do citoesqueleto (microtúbulos e microfilamentos), indicando que a difusão das moléculas ocorria normalmente. As células de Schwann não mostraram sinais de intoxicação que poderiam ser visualizados sob a forma de edema do citoplasma e rejeição das bainhas. Contudo, convém apontar que, as células de Schwann são elementos muito resistentes que se recuperam rapidamente de uma agressão, independentemente do agente agressor¹⁴. Os ratos eutanasiados nos tempos estudados (2, 4, 6 e 8 dias pós-injeção) não apresentaram alteração dessas células.

As bainhas de mielina apresentaram aspecto normal com eventuais deformidades explicadas como decorrentes de artefato de processamento. O sistema nervoso periférico, embora com características diferentes do sistema nervoso central (notadamente pela presença de matriz extracelular colagênica no primeiro), é um tecido delicado. Isto significa que a manipulação pode induzir artefatos nas bainhas e nos fascículos, o que dificulta a interpretação das imagens¹⁵.

Em vários cortes semifinos e ultrafinos foram visualizados fibroblastos e feixes de fibras colágenas, o que caracteriza a morfologia normal do nervo. Também foram observados ocasionais mastócitos repletos de grânulos. Em qualquer tipo de agressão aos nervos periféricos, os mastócitos proliferam, sem que se conheça ainda a real causa dessa proliferação e a função que ela desempenharia¹⁴. Nos cortes analisados, não foi detectada proliferação dessas células.

Em nenhum dos cortes foi observada a presença de células inflamatórias que seriam abundantes no caso de lesão aos axônios ou à mielina¹⁶. A ausência de alterações observáveis na ultraestrutura até o 8º dia pós-injeção sugere que não haverá alterações quando da aplicação a longo prazo dos mesmos anestésicos.

No entanto, os resultados obtidos com uma droga devem ser cuidadosamente extrapolados para outra mesmo que sejam estruturalmente semelhantes¹⁷. Além disso, múltiplos

fatores interferem na liberação do AL pela microesfera polimérica como a natureza e o peso molecular do polímero.

Considerando que um dos sinais da injeção intraneural acidental é a resistência à introdução da agulha ou aumento da pressão necessária para a injeção do AL, é possível afastar a hipótese de ter ocorrido esse tipo de falha técnica no presente experimento uma vez que o anesthesiologista não relatou tais ocorrências. Além disso, nenhuma amostra desse estudo apresentou evidências de degeneração walleriana das fibras dentro dos fascículos ou do perineuro. Apenas injeções com alta pressão causariam déficit neurológico detectável e alterações histológicas da lesão aos fascículos.

O objetivo da histomorfometria foi mensurar possíveis alterações do diâmetro dos axônios considerando que o início do processo de degeneração walleriana provoca edema inicial e posterior desintegração axonal.

A análise histomorfométrica dos axônios revelou uma tendência à diferença significativa entre os grupos BE e MP em função da dificuldade encontrada para obter cortes transversais homogêneos dos axônios (visível nas imagens selecionadas). Pode-se observar que, em alguns cortes semifinos, a orientação axonal foi oblíqua, o que levou a uma distorção no resultado das medições. Uma maneira de minimizar as consequências de uma análise tendenciosa devido às diferentes apresentações dos axônios seria o estudo individual da relação diâmetro do axônio/espessura da bainha de mielina.

Nas condições deste estudo, a aplicação aguda de microesferas com bupivacaína e bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% sobre nervo ciático de ratos Wistar não apresentou efeitos deletérios aos nervos. Da mesma forma, as microesferas puras e a bupivacaína em excesso enantiomérico de 50% não provocaram alterações ultraestruturais dos nervos estudados.

CONCLUSÃO

Em nenhum dos grupos foram observadas alterações histopatológicas dos axônios e da mielina, indicando que não houve inflamação. Concluiu-se que, nas condições deste estudo, a aplicação de microesferas com BP e BP em excesso enantiomérico de 50% sobre o nervo ciático de ratos Wistar não causa alterações neurotóxicas diretas.

REFERÊNCIAS/REFERENCES

1. Kalichman MW, Moorhouse DF, Powell HC et al. – Relative neural toxicity of local anesthetics. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1993;52:234-240.
2. Dyhre H, Soderberg L, Bjorkman S et al. – Local anesthetics in lipid-depot formulations – Neurotoxicity in relation to duration of effect in a rat model. *Reg Anesth Pain Med*, 2006; 31:401-408.
3. Araujo DR, Fraceto LF, Braga AFA, Paula E – Sistemas de liberação controlada com bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25): Efeitos da complexação com ciclodextrinas no bloqueio do nervo ciático em camundongos. *Rev Bras Anesthesiol*, 2005;55:316-328.

4. Araujo DR, Pinto LM, Braga AFA, Paulo E – Formulações de anestésicos locais de liberação prolongada: Aplicações terapêuticas. *Rev Bras Anesthesiol*, 2003; 53:663-671.
5. Simonetti MPB, Valinetti EA, Ferreira, FMC – Evaluation of the local anesthetic activity of S(-) bupivacaine: experimental study *in vivo* in the rat sciatic nerve. *Rev Bras Anesthesiol*, 1997;47:425-434.
6. Tanaka PP, Estebe JP, Campor R et al. – Preparation, characterization and *in vitro* evaluation of 50% enantiomeric excess bupivacaine (S75-R25)-loaded microspheres. *Rev Bras Anesthesiol*, 2008;58:15-22.
7. Oliveira, RM – Análise comparativa entre microesferas, microesferas de bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%, microesferas de bupivacaína e bupivacaína em excesso enantiomérico de 50%: estudo *in vivo* após bloqueio do nervo ciático em ratos. [Tese] Florianópolis: Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná. 2008.
8. Estebe JP, Myers RR – Amitriptyline Neurotoxicity. Dose-related pathology after topical application to rat sciatic nerve. *Anesthesiol*, 2004;100:1519-1525.
9. Mrak RE – The big eye in the 21st century: The role of electron microscopy in modern diagnostic neuropathology. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002;61:1027-1039.
10. Uchino H, Matsumura Y, Megishi T et al. – Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Brit J Cancer*, 2005;93:678-687.
11. Blanco MD, Bernardo MV, Gomez C – Bupivacaine-loaded comatrix formed by albumin microspheres included in a poly(lactide-co-glycolide) film: *in vivo* biocompatibility and drug release studies. *Biomater*, 1999;20:1919-1924.
12. Matey L, Luzzati V, Villegas GM et al. – Order-disorder phenomena in myelinated nerve sheaths. IV. The disordering effects of high levels of local anesthetics on rat sciatic and optic nerves. *J Mol Biol*, 1992;226:535-545.
13. Song L, Xiao H, Yank H et al. – Peripheral anti-hyperalgesic effect and neurotoxicologic screening of amitriptyline and bupivacaine on sciatic nerve blockade chronically on neuropathic pain in rats. *Chin J Repar Reconstr Surg*, 2009;23:827-831.
14. Cavanagh JB – Reactions of neurons and Schwann cells to injury. Em: WELLER, RO. *Nervous System, Muscle and Eyes*. 3ª ed. 1990. Edinburgh: Churchill Livingstone. Cap.19 p.533-543.
15. Summers BA, Cummings JF, Lahunta A – Diseases of the peripheral nervous system. *Veterinary Pathology*. Cap. 7, p. 402-501, 1995.
16. Sanchez M, Bondan EF, Lallo MA et al. – Marcação imuno-histoquímica da resposta macrofágica e astrocitária no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio e tratados com ciclofosfamida. *Arq Neuro-psiquiatria*, 2006;64:787-793.
17. Le Coree P, Rytting JH, Gajan V et al. – *In vitro* controlled release kinetics of local anaesthetics from poly(D, L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Microencapsul*, 1997;14:243-255.

Resumen: Tanaka PP, Torres MF, Tenorio SB – Análisis del Potencial Citotóxico Agudo de la Bupivacaína y Bupivacaína en Exceso Enantiomérico de 50% (S75-R25) Incorporadas a Microesferas sobre el Nervio Ciático de Ratonos.

Justificativa y objetivos: La duración del efecto de los anestésicos locales (AL), puede ser ampliada por su incorporación a los sistemas de liberación prolongada como microesferas. Sin embargo, la posibilidad de que los sistemas de liberación prolongada de AL sean neurotóxicos, no ha recibido la debida atención en la literatura. Este estudio tuvo el objetivo de investigar los efectos de microesferas de ácido

poliláctico-co-glicólico puras, rellenos con bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% o con bupivacaína (BP), como también los efectos de la bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% en nervio ciático de ratones Wistar.

Método: Los ratones se dividieron en cuatro grupos de acuerdo con el tiempo de evaluación (dos, cuatro, seis y ocho días), y fueron denominados conforme a la solución inyectada sobre el nervio ciático: microesferas con bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% (MBE), microesferas con bupivacaína (MB); microesferas puras (MP) y bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% (BE).

Resultados: En los cortes semifinos se observó la distribución regular homogénea en las fibras de colágeno en el endoneuro y no se comprobó ninguna alteración degenerativa de los axones o de las vainas de mielina. En los cortes ultrafinos fueron observados axones mielinizados y fibras de Remak de aspecto normal con axoplasma presentando una distribución homogénea de neurofilamentos y microtúbulos. El análisis histomorfométrico de los axones no reveló diferencias significativas entre los diámetros de los axones de los grupos estudiados.

Descriptores: ANESTÉSICOS, Local, bupivacaína, bupivacaína (S75-R25), toxicidad; ANIMALES, Ratón.