

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 Ratonés

Pedro Paulo Tanaka ¹, Maria Fernanda Torres ², Sergio Bernardo Tenorio ³

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 Ratonés.

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, rellenas 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.

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

©2012 Elsevier Editora Ltda. Reservados todos los derechos.

INTRODUCCIÓN

La administración de anestésico local (AL) directamente sobre los nervios o troncos nerviosos para bloquear la percepción del dolor por el paciente, es una técnica eficaz. Los mecanismos fisiológicos de la neurotoxicidad causada por los ALs, fueron relacionados con la inhibición del transporte axonal, desestabilización del citoesqueleto axonal, degeneración axonal e isquemia neural ¹. Sin embargo, pocos estudios han descrito el mecanismo responsable por el traumatismo y si el traumatismo es causado directa o indirectamente por el AL.

Algunos autores ² comprobaron que concentraciones mayores de lidocaína y bupivacaína (BP) generan un bloqueo

más duradero en los nervios ciáticos de los ratones, sin embargo, son claramente neurotóxicas bajo el análisis histopatológico. Esos resultados sugieren la existencia de una relación entre el tiempo prolongado de anestesia y la lesión neurotóxica.

Algunos estudios han investigado la farmacodinámica y la farmacocinética de la intoxicación aguda provocada por ALs, y pese a que existen relatos en la literatura sobre la neurotoxicidad ¹, no existen estudios experimentales *in vivo* sobre el uso de microesferas de bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% (S75-R25), como tampoco de la evaluación morfológica de los efectos neurotóxicos de ese anestésico por microscopía óptica (MO) o electrónica (ME).

Este estudio quiso investigar los efectos citotóxicos en el nervio ciático de ratones Wistar de las microesferas de ácido poliláctico-co-glicólico puras, rellenas con bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% (S75-R25) y con BP, como también de la bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% (S75-R25).

MÉTODOS

La población de la investigación se constituyó de 16 ratones Wistar machos con aproximadamente tres meses de edad y 300 g de peso promedio, provenientes del Criadero de la Uni-

Recibido de la Universidad Positivo, Brasil.

1. Doctor; Profesor asociado, Universidad Federal de Paraná (UFPR)
2. Profesora Adjunta, UFPR
3. Profesor Adjunto, Asignatura de Anestesiología, UFPR; Jefe del Servicio de Anestesiología de la UFPR

Artículo sometido el 22 de mayo de 2011.
Aprobado para su publicación el 19 de junio de 2011.

Correspondencia para:
Dra. Maria Fernanda Torres
Rua Venezuela, 54
Bacacheri
82510100 – Curitiba, PR, Brasil
E-mail: mariafernandatorres@gmail.com

versidade Positivo. Durante todo el período de experimentación, los animales fueron mantenidos en una sala climatizada (temperatura promedio de 22°C), con fotoperíodo de 12 horas con libre acceso al agua y al pienso. El proyecto de este estudio se sometió a la apreciación y aprobación del Comité de Ética en el Uso de Animales de la *Universidade Positivo*.

Los experimentos fueron realizados en un ambiente tranquilo y fueron llevados a cabo por el mismo investigador que no conocía el fármaco inyectado. Los ratones fueron divididos en 4 grupos de 4 animales denominados de acuerdo con la solución inyectada sobre el nervio ciático en: microesferas con bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% (MBE), microesferas con bupivacaína (MB); microesferas puras (MP), y bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% (BE).

Después de la anestesia de los ratones por vaporización de halotano entre el 2% y el 4% en oxígeno por máscara facial, se pudo hacer la manipulación para la inyección de la solución directamente sobre el nervio ciático.

Después de 2^o, 4^o, 6^o y 8^o días de la aplicación de las soluciones, los animales fueron sacrificados por inyección intraperitoneal de Tiopental al 2,5% y enseguida, la extremidad proximal del nervio ciático se disecó y se introdujo en una solución de glutaraldehído al 3% en tapón cacodilato 0,4 M y fue derivada para el procesamiento en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Federal de Paraná (UFPR).

La evaluación del potencial neurotóxico del fármaco se hizo en MO y MET investigando: desmielinización, degeneración axonal y signos de inflamación evidenciados por infiltración de células inflamatorias.

Los cortes semifinos (0,5 µm) se coloraron por el azul de toluidina y los campos que tienen una buena calidad de imagen se fotografiaron y sometieron a la histomorfometría por la aplicación del programa *Image Pro Plus* versión 4,5. Se realizó la medición del diámetro de 10 axones por campo fotografiado totalizando el registro del diámetro de 100 axones por nervio.

Los cortes ultrafinos (70 nm) fueron colorados con Uranila al 2% y solución de Reynolds para posterior análisis en microscopio JEOL JEM – 1.200 EX II del Centro de Microscopía Electrónica de la UFPR.

Los resultados obtenidos por la histomorfometría de los nervios ciáticos fueron comparados dos a dos por medio del test no paramétrico de Mann-Whitney. El nivel de significancia considerado fue de 0,05, siendo corregido por Bonferroni. En función de haberse hecho seis comparaciones de los grupos dos a dos, serán consideradas las diferencias significativas aquellas para las cuales el valor de p es menor que 0,008.

RESULTADOS

Este estudio presenta un análisis sistemático de los efectos toxicológicos sobre el sistema nervioso periférico entre los grupos estudiados entre las soluciones aplicadas sobre el nervio ciático de ratones Wistar. Usamos la MET para el análisis ultra estructural del nervio ciático de ratones Wistar buscando evidencias sobre el efecto neurotóxico de esos AL y de las propias microesferas. Junto con el análisis ultra estructural fue realizada la histomorfometría bajo la microscopía de luz en busca de

diferencias entre los diámetros de los axones que pudiesen ser interpretadas como alteración neurotoxicológica.

En los cortes semifinos de todos los grupos y en todos los tiempos estudiados (2, 4, 6 y 8 días), ilustrados en la Figura 1, se observan fibras de aspecto normal dentro de los fascículos. Podemos ver axones con un diámetro pequeño, con una vaina de mielina fina, y axones mayores con una vaina de mielina espesa. Hay una distribución regular homogénea en las fibras de colágeno en el endoneuro. No se observan alteraciones degenerativas de los axones o de las vainas de mielina. En varios cortes semifinos fueron observados mastocitos. No se observaron células inflamatorias en el endoneuro o en el perineuro. El aspecto desarreglado de algunas vainas de mielina es interpretado como un artefacto de procesamiento.

En los cortes ultrafinos en todos los grupos de todos los tiempos (2, 4, 6 y 8 días), ilustrados en la Figura 2, se observan axones mielinizados de aspecto normal y axones no mielinizados envueltos por células de Schwann en las estructuras designadas como fibras de Remak. El axoplasma contiene una distribución homogénea de neurofilamentos y microtúbulos con ocasionales mitocondrias. En algunos cortes, se ven núcleos de las células de Schwann asociadas con el internodo de mielina y con las fibras de Remak. Se comprueba la presencia de fibroblastos y mastocitos en el endoneuro. En todos los cortes examinados, son conspicuas las fibras de colágeno en contacto con la membrana basal de las células de Schwann.

Los cortes semifinos de los nervios ciáticos de cada ratón se fotografiaron y se sometieron al análisis histomorfométrico con la ayuda del programa *Image Pro Plus* versión 4,5. En cada nervio ciático, fueron registrados los diámetros de 100 axones, considerando como criterio de selección del axón la coloración y el posicionamiento central de los axones en el campo fotografiado. Para el análisis estadístico, fue considerado el promedio de las 100 medidas obtenidas en cada ratón.

Se comprobó la hipótesis nula de resultados iguales en los dos grupos bajo comparación, versus la hipótesis alternativa de resultados diferentes. La Tabla I presenta los diámetros mínimo, máximo y medio de los axones, considerando las 100 mediciones para cada uno de los ratones. Notamos que uno de los ratones del grupo M tuvo el menor promedio del grupo. También observamos que el grupo M presentó una mayor dispersión de los resultados.

Tabla I – Estadística Descriptiva del Diámetro Medio de las 100 Mediciones de los Axones del Nervio Ciático de los Ratones de los Diferentes Grupos

Grupo	n	Diámetro (µm)				
		Media	Mediana	Mínimo	Máximo	DE
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

BEM: ratones que recibieron inyección extra-neural de microesferas de LVBP en exceso enantiomérico de 50% (S75 – R25); BE: ratones que recibieron inyección extra-neural de LVBP libre; MB: ratones que recibieron inyección extra-neural de microesferas de BP; MP: ratones que recibieron inyección extra-neural de microesferas puras; n = número de ratones por grupo; µm = micrómetros.

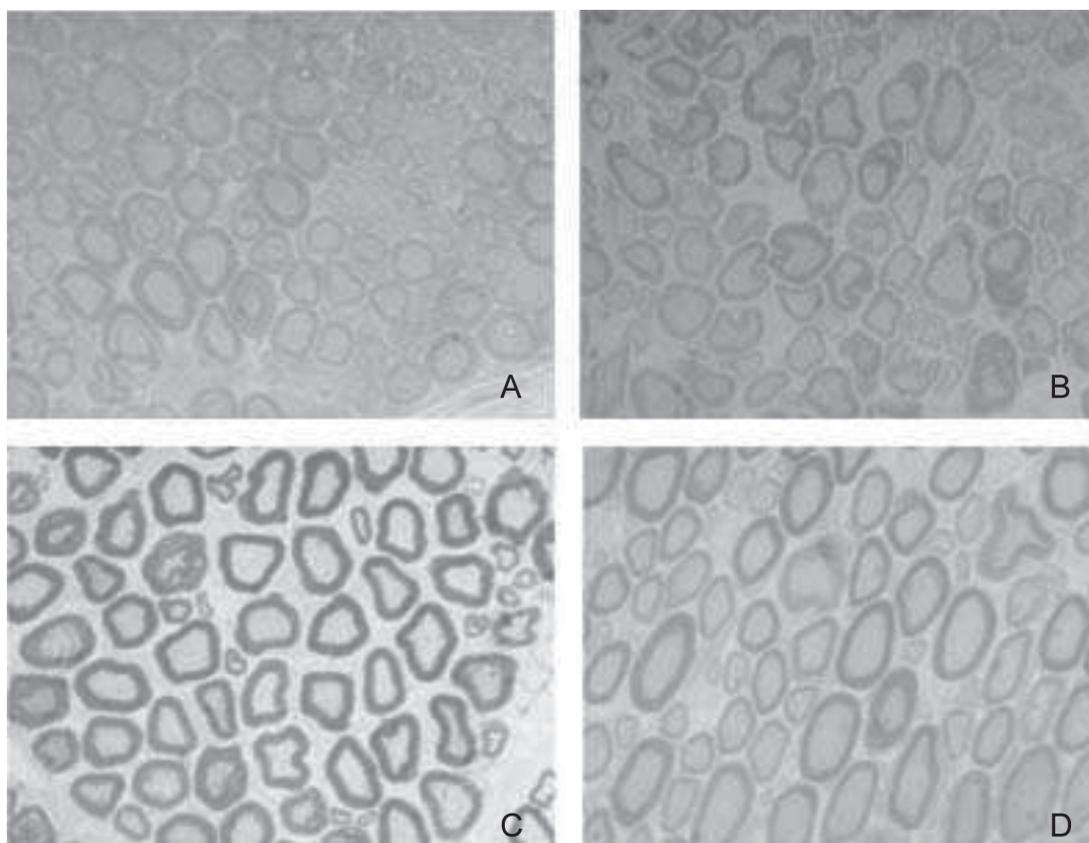


Figura 1 – Cortes Semifinos de los Nervios Bloqueados con Microesferas Conteniendo Bupivacaína en Exceso Enantiomérico de 50%. En las fotografías se observan las características morfológicas normales de los axones en esa magnificación. Los axones están seccionados transversalmente y oblicuamente. Las alteraciones observadas en algunas vainas de mielina son consistentes con los artefactos de procesamiento. A: Ratón 30, 2º día PO; B: Rato 4, 4º día PO; C: Ratón 11, 6º día PO; D: Ratón 23, 8º día PO. Coloración: azul de toluidina. Objetiva 100X.

En la Tabla II aparecen los valores de p de las comparaciones de los grupos dos a dos. Se testó la hipótesis nula de resultados iguales en los dos grupos bajo comparación, versus la hipótesis alternativa de resultados diferentes.

Tabla II – Valores de p en las Comparaciones de los Grupos dos a dos

Grupos bajo comparación	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

BEM: ratones que recibieron inyección extra-neural de microesferas de LVBP en exceso enantiomérico de 50% (S75 – R25); BE: ratones que recibieron inyección extra-neural de LVBP libre; MB: ratones que recibieron inyección extra-neural de microesferas de BP; MP: ratones que recibieron inyección extra-neural de microesferas puras.

*Test no paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,008$.

DISCUSIÓN

La toxicidad de la BP para los sistemas nervioso central y cardiovascular conllevó a la investigación de nuevos ALs con un perfil semejante de bloqueo y menos tóxicos, surgiendo así nuevas preparaciones como la bupivacaína en exceso enantiomérico de 50%. En un estudio sobre la evaluación de la eficacia del bloqueo de nervio ciático de ratones caseros³, la mezcla enantiomérica de BP (S75-R25) fue considerada como una alternativa para el desarrollo de formulaciones de liberación controlada más seguras y eficaces que la BP (S50-R50).

Investigaciones con formulaciones de AL de liberación controlada han mostrado resultados promisorios. A pesar de los grandes avances obtenidos en el desarrollo de esas formulaciones, todavía son necesarios estudios para evaluar la neurotoxicidad local y poder garantizar su utilización segura en la rutina clínica⁴.

El uso de un pequeño número de animales ($n = 16$) se debe a varios factores: por un lado las limitaciones provenientes de las nuevas directrices de bienestar animal y por el otro,

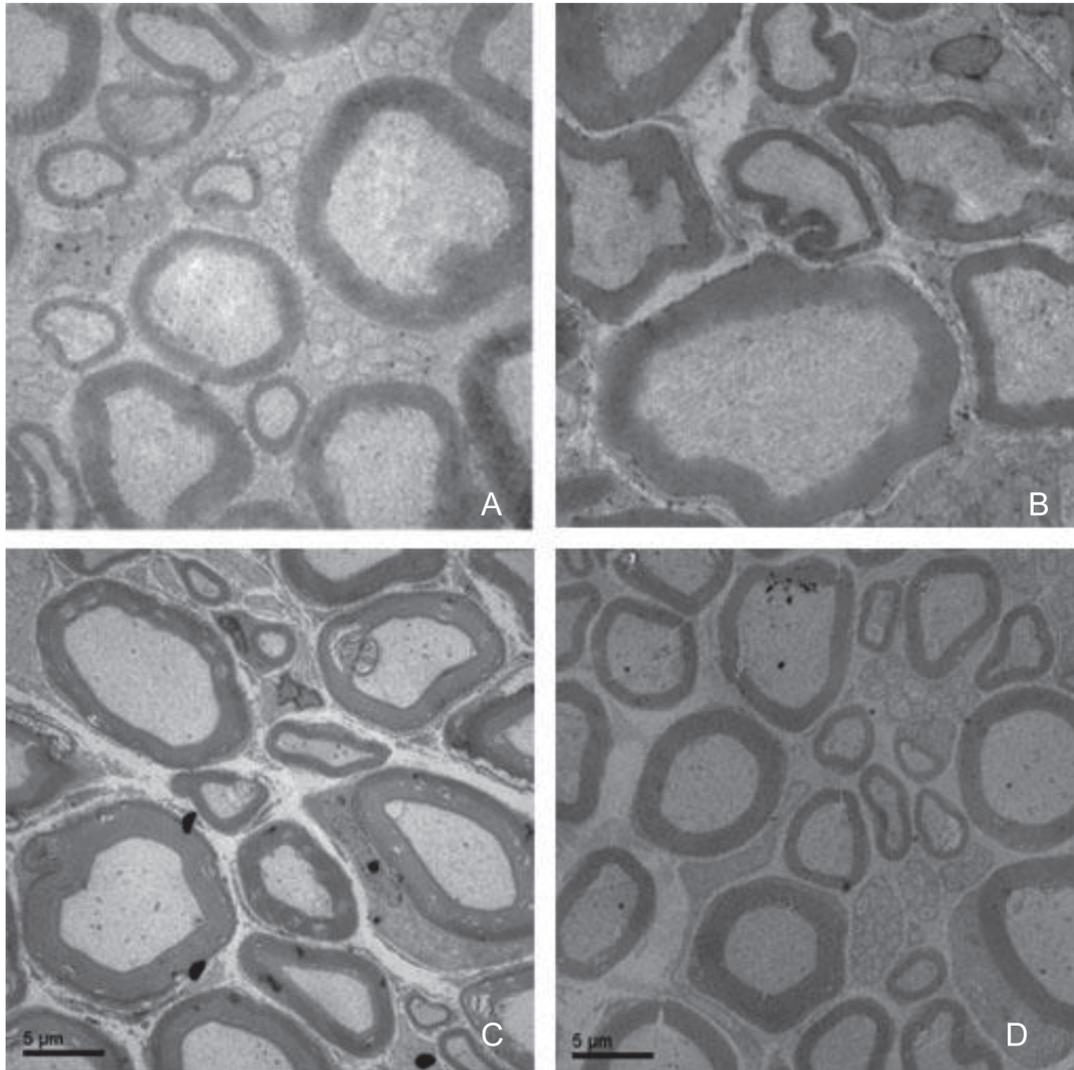


Figura 2 – Ultra micrografías Electrónicas de los Nervios Ciáticos Anestesiados con Microesferas Conteniendo Bupivacaína en Exceso Enantiomérico de 50%.

NOTA: Se observaron axones mielinizados y fibras de Remak (*) y en una de ellas se visualiza el núcleo de la célula de Schwann (N). Entre las fibras nerviosas, se observan haces de colágeno. Algunas de las vainas de mielina presentan una deformación de las lamelas provenientes de los artefactos de procesamiento. En el interior de los axones se observan microtúbulos y neurofilamentos con una distribución homogénea. A: Ratón 2, 2º día PO. B: Ratón 9, 4º día PO. C: Ratón 14, 6º día PO. D: Ratón 31, 8º día PO.

las limitaciones financieras que un estudio con la metodología desarrollada exige.

El nervio ciático es el punto de partida para el estudio *in vivo* de AL componiendo, junto con las investigaciones *in vitro*, los requisitos de la fase preclínica de nuevos compuestos antes de iniciar las fases de investigación en el ser humano ⁵. El nervio ciático de ratón es un modelo experimental mamífero bien establecido para las investigaciones sobre toxicología del nervio periférico ⁶.

La metodología de la inyección fue adecuada porque, después de la recuperación de la capacidad propioceptiva del miembro anestesiado, los animales no indicaron secuelas motoras o sensoriales. Esos objetivos formaron parte

del estudio realizado en paralelo con el mismo grupo de animales ⁷.

Es un imperativo que un fármaco sea testado para la neurotoxicidad periférica usando las técnicas neuropatológicas establecidas con mayor sensibilidad y resolución que las preparaciones de parafina coloradas con hematoxilina y eosina. Aunque sea útil para la evaluación de las alteraciones histológicas más evidentes, la MO puede ocultar alteraciones recientes entre los axones, células de Schwann y mielina que indiquen mecanismos neurotoxicológicos ⁸.

La comprobación de las alteraciones estructurales inducidas por fármacos depende del análisis ultra estructural. La elección del estudio por análisis de cortes semifinos y ultrafinos, puede ser considerada la más apropiada porque muchas

veces, las alteraciones clínicas no corresponden con las alteraciones histológicas, o son muy tenues, por tanto, solamente el estudio ultra estructural permite observar las lesiones discretas⁹⁻¹⁰.

Teniendo en cuenta la necesidad de un análisis juicioso, en busca de una lesión axonal y desmielinización, el presente estudio presenta la evaluación de la ultra estructura de nervios ciáticos.

La microscopía electrónica fue indicada como un test más sensible capaz de diferenciar las lesiones neurotóxicas ultra estructurales². Al evaluar los efectos neurotóxicos de seis formulaciones lipídicas de depósito diferentes constituidas por una mezcla de BP y lidocaína sobre el nervio ciático de ratones, se observó, a través de MO, una tumefacción axonal, degeneración neuronal y desmielinización en los nervios anestesiados con un 64% de BP y lidocaína en la proporción de 4:1. A pesar de esos hallazgos, concluimos que la BP puede ser usada como un compuesto activo de formulaciones de depósito y se sugiere que su potencial neurotóxico debe ser evaluado por test más sensibles, tal como la MET.

En ninguna de las muestras de este estudio hubo indicios de neurotoxicidad cuando se analizaron tanto por MO como por ME.

El proceso patológico indicativo de neurotoxicidad más mencionado en la literatura es la degeneración walleriana, descrita por primera vez por Augustus Waller en 1850. Es un proceso complejo desencadenado por un traumatismo al axón y con la degeneración del axón y de sus células de soporte, conjunto conocido como fibra nerviosa. Inicialmente, ocurre un agrupamiento de organelas y de otras estructuras del axoplasma, evolucionando al edema del axón y a su desintegración. La mielina se desintegra y después es fagocitada por las células de Schwann y por los macrófagos que son reclutados en un gran número, como respuesta al aumento del factor de necrosis tumoral y de proteínas proinflamatorias⁸.

Un aumento de la permeabilidad de la barrera hematoneural provocados por los ALs, puede aumentar la osmolaridad del fluido intersticial, conllevando a la reducción del tamaño de los axones o a la alteración de los gradientes de concentración de los iones inorgánicos y por ende, a la disminución de la conducción nerviosa¹.

En este estudio, fue considerada la hipótesis de que la presencia de las microesferas y la liberación lenta del AL causarían una alteración de la permeabilidad de los vasos sanguíneos locales, haciéndolos más permeables y permitiendo la extravasación de las proteínas osmóticamente activas que normalmente no son encontradas próximas al endoneuro, y que podrían atraer el agua y limitar así, el espacio de los axones y células endoneurales. En las imágenes de ME, sin embargo, no se vio la distensión del espacio interaxonal e intercelular en el endoneuro, que caracterizaría la extravasación de plasma.

Algunos autores¹¹ implantaron una matriz con microesferas en el tejido subcutáneo de ratones Wistar, y observaron que las microesferas empezaron a degradarse 15 días después de la aplicación del implante. Sin embargo, en el presente estudio, ninguna microesfera fue observada sobre los

nervios ciáticos estudiados, indicando que las microesferas depositadas ya estaban degradadas 2 días después de su aplicación. Una razón para esa discordancia reside en la matriz utilizada en la producción de las microesferas.

Al contrario de la inestabilidad de la vaina de mielina demostrada a través de ME y por rayos X por Mateu y colaboradores¹², después de la aplicación de tetracaína sobre el nervio óptico y ciático aislado de ratones, en este estudio no fueron evidenciadas alteraciones en las células de Schwann, que incluyen: vacuolización y desintegración citoplasmáticas y acumulación de gotículas de grasa en el citoplasma que indicarían una interrupción del metabolismo lipídico.

La posibilidad de una reacción inflamatoria causada por el procedimiento quirúrgico, se desechó en este estudio, considerando que la aplicación de las microesferas y de la bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% fue por inyección transcutánea.

Ninguna alteración estructural se observó en el presente estudio después de la aplicación extra neural de microesferas conteniendo BP y BP en exceso enantiomérico de 50%. En otro estudio¹³ tampoco fueron encontradas anomalías en la investigación de los efectos neuro toxicológicos de la amitriptilina y de la BP en el nervio ciático de ratones. Las muestras que fueron retiradas después del 1, 3, 5 y 7 días de la aplicación de los fármacos, fueron analizadas bajo MO y tenían el epineuro y endoneuro intactos, fibras nerviosas organizadas, pocas células inflamatorias y una insignificante degeneración walleriana.

Los ALs usados en el presente estudio, libres o incorporados a las microesferas, como también las propias microesferas, no indujeron a las alteraciones histológicas o ultra estructurales en los nervios ciáticos evaluados. En las imágenes obtenidas, las estructuras nerviosas (fibras, células y espacio extracelular), no mostraron alteraciones: los axones presentaron una distribución homogénea de componentes del citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos), indicando que la difusión de las moléculas se daba normalmente. Las células de Schwann no mostraron signos de intoxicación que podrían ser visualizados bajo la forma de edema del citoplasma y un rechazo de las vainas. Sin embargo, es bueno remarcar, que las células de Schwann son elementos muy resistentes que se recuperan rápidamente de una agresión, independientemente del agente agresor¹⁴. Los ratones sacrificados en los tiempos estudiados (2, 4, 6 y 8 días posteriormente a la inyección), no tenían alteración en esas células.

Las vainas de mielina presentaron un aspecto normal con eventuales deformidades explicadas como provenientes de artefacto de procesamiento. El sistema nervioso periférico, aunque con características diferentes del sistema nervioso central (comprobadamente por la presencia de una matriz extracelular colagénica en el primero), es un tejido delicado. Eso significa que la manipulación puede inducir a artefactos en las vainas y en los fascículos, lo que dificulta la interpretación de las imágenes¹⁵.

En varios cortes semifinos y ultrafinos fueron visualizados fibroblastos y haces de fibras colágenas, lo que caracteriza la morfología normal del nervio. También se observaron ocasio-

nales mastocitos repletos de gránulos. En cualquier tipo de agresión a los nervios periféricos, los mastocitos proliferan, sin que se conozca todavía la real causa de esa proliferación y la función que ella desempeñaría ¹⁴. En los cortes analizados, no se detectó la proliferación de esas células.

En ninguno de los cortes fue observada la presencia de células inflamatorias que serían abundantes en el caso de una lesión a los axones o a la mielina ¹⁶. La ausencia de alteraciones observables en la ultra estructura hasta el 8º día de la posterior inyección, sugiere que no habrá alteraciones cuando se apliquen a largo plazo los mismos anestésicos.

Sin embargo, los resultados obtenidos con un fármaco deben ser cuidadosamente extrapolados para otro fármaco aunque sean estructuralmente similares ¹⁷. Además, múltiples factores interfieren en la liberación del AL por la microesfera polimérica como la naturaleza y el peso molecular del polímero.

Considerando que uno de los signos de la inyección intraneural accidental es la resistencia a la introducción de la aguja o al aumento de la presión necesaria para la inyección del AL, es posible apartar la hipótesis de que haya ocurrido ese tipo de fallo técnico en el presente experimento, una vez que el anestésico no relató tales incidencias. Además, ninguna muestra de ese estudio presentó evidencias de degeneración walleriana de las fibras dentro de los fascículos o del perineuro. Solamente las inyecciones con una alta presión causarían un déficit neurológico detectable y alteraciones histológicas de la lesión a los fascículos.

El objetivo de la histomorfometría fue mensurar posibles alteraciones del diámetro de los axones considerando que el inicio del proceso de degeneración walleriana provoca un edema inicial y la posterior desintegración axonal.

El análisis histomorfométrico de los axones reveló una tendencia a la diferencia significativa entre los grupos BE y MP, en función de la dificultad encontrada para obtener cortes transversales homogéneos de los axones (eso se puede ver en las imágenes seleccionadas). Podemos observar que, en algunos cortes semifinos, la orientación axonal fue oblicua, lo que conllevó a una distorsión del resultado de las mediciones. Una manera de minimizar las consecuencias de un análisis tendencioso debido a las diferentes presentaciones de los axones, sería el estudio individual de la relación diámetro del axón/grosor de la vaina de mielina.

En las condiciones de este estudio, la aplicación aguda de microesferas con bupivacaína y bupivacaína en exceso enantiomérico de 50% sobre el nervio ciático de ratones Wistar, no presentó efectos perjudiciales para los nervios. De la misma forma, las microesferas puras y la bupivacaína en exceso enantiomérico de 50%, no generaron alteraciones ultra estructurales de los nervios estudiados.

CONCLUSIONES

En ninguno de los grupos se observaron alteraciones histopatológicas de los axones y de la mielina, indicando que no hubo inflamación. Concluimos por tanto que, bajo las condiciones

de este estudio, la aplicación de microesferas con BP y BP en exceso enantiomérico de 50% sobre el nervio ciático de ratones Wistar, no causa alteraciones neurotóxicas directas.

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, Nraga AFA – 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 Anestesiologia*, 2005;55,316-328.
4. Araujo DR, Pinto LM, Braga AFA – Formulações de anestésicos locais de liberação prolongada: Aplicações terapêuticas. *Rev Bras Anestesiologia*, 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 Anestesiologia*, 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 Anestesiologia*, 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. *Anesthesiology*, 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 Repair 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.