



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
PETRÓLEOS MEXICANOS
SUBDIRECCIÓN DE SERVICIOS DE SALUD
GERENCIA DE SERVICIOS MÉDICOS
HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES**

Efectos tóxicos De los agentes anestésicos bupivacaína, fentanyl y morfina, en modelos de cultivo de neuronas y oligodendrocitos de ratas Wistar y Sprague Dawly a dosis equivalentes a las usadas en la práctica clínica, en el H.C.S.A.E.

**TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN
ANESTESIOLOGIA**

DRA. ANAYANSI VENTURA SAUCEDO

**DRA. GLORIA ALVAREZ BOBADILLA
DR. JAVIER VENTURA JUAREZ**

MEXICO, D. F. 3 DE AGOSTO DEL 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**DR. CARLOS FERNANDO DÍAZ ARANDA
DIRECTOR**

**DRA. JUDITH LÓPEZ ZEPEDA
JEFA DE ENSEÑANZA**

**DR. JOSE LUIS REYNADA TORRES
PROFESOR TITULAR DE ANESTESIOLOGIA**

**DRA. GLORIA MARIA ALVAREZ BOBADILLA
ASESOR DE TESIS**

**DR. JAVIER VENTURA JUAREZ
ASESOR DE TESIS**

ÍNDICE

ÍNDICE	3
RESÚMEN	5
DEFINICIÓN DE PROBLEMA	6
MARCO TEÓRICO	7
· Antecedentes	7
· Compuestos opioides	7
· Recetores opioides	8
· Bupivacaína	9
· Implicación de receptores opioides en la diferenciación de neuronas y oligodendrocitos	10
· Compuestos opioides y patologías	10
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
TIPO Y DISEÑO DEL ESTUDIO	14
DEFINICIÓN DEL UNIVERSO	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15
PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
ANEXOS	
· Tabla 1	36
· Tabla 2	36
· Figura 1	37

· Grafica 1	38
· Figura 2	38
· Gráfica 2	39
· Figura 3	40
· Grafica 3	41
· Figura 4	42
· Figura 5	42
· Figura 6	42
· Gráfica 4	43
· Figura 7	44
· Figura 8	44
BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN:

OBJETIVO: Se analizaron los efectos tóxicos (cambios morfológicos: inhibición del crecimiento neuronal y disminución en producción de neurotubulos y de mielina) de los anestésicos bupivacaína hiperbarica al 0.5%, fentanilo y morfina, en modelos de cultivo de neuronas de médula espinal y oligodendrocitos de nervio óptico de ratas Sprague Dawley, a dosis equivalentes a las usadas en la práctica clínica. **MÉTODOS:** Se realizó el estudio experimental basado en evidencias, en la Universidad Autonoma de Aguascalientes y el H.C.S.A.E, incluyendo 48 ratas Sprague Dawley hembra preñadas de las cuales se obtuvieron embriones de 14 días de gestación y de estos se obtuvieron neuronas de médula espinal y se realizaron cultivos de 2 millones de neuronas y ratas recién nacidas Sprague Dawley de 12 días de los cuales se obtuvieron nervio óptico y se cultivaron 2 millones de oligodendrocitos. **RESULTADOS:** La bupivacaína indujo sobre-expresión de MAP2. El porcentaje de mortalidad neuronal para la morfina del 22%, para el fentanyl fue del 25%; para la bupivacaína del 20% y para la naloxona del 10%. En los cultivos de oligodendrocitos las células estimuladas con bupivacaína presentaron mayor número de prolongaciones celulares, la morfina tuvo efecto estimulador en crecimiento de somas. **CONCLUSIONES:** Morfina y Fentanyl inhiben la expresión de MAP2 y el desarrollo morfológico de neuronas de médula espinal de fetos de 14 días de rata Wistar; Bupivacaína estimula la expresión de MAP2. En forma general, los fármacos opioides analizados son estimulantes de la viabilidad celular para las neuronas en cultivo. Morfina estimula la expresión de MBP en oligodendrocitos de nervio óptico de ratas Wistar recién nacidas, por lo que induce su diferenciación celular por disminución de expresión de las moléculas O4. Fentanyl y naloxona al parecer no tienen efecto sobre la expresión de O4.

DEFINICION DEL PROBLEMA

El uso de anestésicos locales como la bupivacaina pesada y otros fármacos no catalogados como anestésicos locales, ni de uso intratecal tales como fentanyl y morfina son ocupados en la práctica común de la anestesia, sin embargo, la literatura refiere que la administración por vía subaracnoidea los ha vinculado con probable daño neuronal y alteración en la regeneración de mielina, que pudiera explicar la sintomatología post anestésica, creando así la necesidad de investigar su efecto y seguridad en un modelo *in vitro* de neuronas y oligodendrocitos a dosis equivalentes a las usadas en la práctica clínica, ya que los reportes y estudios de investigación a este respecto, se basan en el ámbito clínico, cuando el daño ya está presente en los pacientes, o bien asociada a dosis y concentraciones mayores reportadas en la práctica anestésica.

MARCO TEÓRICO

ANTECEDENTES

Los principios de la anestesia local y general datan desde 1844 cuando Horace Wells emplea óxido nítrico para aliviar el dolor durante la extracción dental, poco después William Thomas Green Morton introduce el éter en 1846 con el mismo fin (Calatayud and González, 2003) y Snow emplea por primera vez el cloroformo en 1857 (Costarino and Downess, 2005). La anestesia intratecal se origina poco después del descubrimiento de la punción lumbar (PL) que data del siglo XIX, cuando Heinrich Quincke en 1887 utilizó la técnica para disminuir la presión de una hidrocefalia, no obstante Von Ziemssen en 1893 empleó la PL con fines diagnósticos y terapéuticos. Así en 1898 se realiza la primera anestesia raquídea, cuando Agust Karl Bier se aplica 3 ml de cocaína al 0.5% vía intratecal. Posteriormente W. Sertürner (1903), purificó la morfina, principal constituyente alcaloide de los extractos de opio, el cual produce analgesia por la unión a receptores endógenos μ (MU), inhibiendo las corrientes de calcio dependientes de voltaje y regulando la liberación de neurotransmisores relacionados al dolor como la serotonina y norepinefrina (Marks et al., 2009), otros neurotransmisores que participan en la nocicepción son el glutamato y la sustancia P ((Yanagitate and Strichartz, 2006), sin embargo, los compuestos opioides también pueden producir efectos secundarios tales como: constipación, oliguria, fuerte depresión respiratoria, e intensa dependencia física (Jacobson, 1980; Van Ree et al., 2008; Di Cianni et al., 2008; Gallagher R 2007). Las complicaciones más frecuentes en relación a su aplicación intratecal en la médula espinal son dolor de cabeza, meningitis séptica, aracnoiditis adhesiva, meningitis aséptica y síndrome de cauda equina caracterizada por una deficiencia sensorial en el área perianal, incontinencia fecal y urinaria y debilidades en extremidades inferiores. La morfina se usa normalmente a 0.1-0.2 mg pero puede producir efectos contralaterales como prurito, náuseas, vómito y depresión respiratoria de una manera dosis dependiente. Se describe un caso accidental de administración de morfina intratecal (250 mg) en el cual se trató exitosamente con naloxona intratecal, anti-hipertensivos y ventilación mecánica (Rutili A et al., 2007).

COMPUESTOS OPIOIDES.

En sentido estricto, el término opiáceo se emplea para designar a los fármacos derivados del opio, incluyendo la morfina, codeína, y una amplia variedad de compuestos semi-sintéticos derivados de ellos y de la tebaína, otro componente del opio. Por otro lado, el

término opioide, más inclusivo, engloba todos los agonistas y antagonistas con actividad tipo morfina, así como los péptidos opioides sintéticos como el fentanyl (Ohta, 1995; Trescott et al., 2008). Otros agonistas opiáceos sintéticos son el [D-Ala², N-Me Phe⁴, Gly-ol⁵] enkephalin (DAMGO) y [D-Pen^{2,5}] enkephalin (DPDPE) que producen paraparesia espástica después de un corto período de isquemia de la médula espinal en ratas a través de los receptores mu y delta, dicha espasticidad se revirtió con tratamiento intratecal de naloxona y naltrindole (Kakinohana et al., 2006). Fentanyl es un fármaco opioide sintético derivado fentanílico de la piperidina que actúa mediante los receptores μ -opioides, muy liposoluble y por ello penetra en el SNC y sale de él con gran rapidez, además es fácilmente absorbible por la piel (parches Duragesic®) por eso la analgesia es más corta que con morfina, las dosis epidurales recomendadas son 0.05-0.1 mg. La vía espinal no es ciertamente una vía de uso habitual (Florez-Beledo et al., 1998; Bodnar 2007; Ohta, 1995; Andrea M. Trescott et al., 2008; Brodsky, 1986; Bodnar, 2007). Se metaboliza en el hígado a través del complejo enzimático P450-3A4, por lo que los inhibidores de este complejo enzimático en el hígado como el ketoconazol y claritromicina entre otros, provocan su acumulación sanguínea y pueden llevar al paciente a depresión respiratoria fatal (Armstrong et al., 2009).

La morfina tiene buena hidrosolubilidad que le permite ser utilizada en solución por todas las vías de administración posibles y se elimina preferentemente por glucuronidación en posición 3 ó 6, siendo su principal metabolito la morfina 3 glucurónido, en cambio la morfina 6 glucurónido interactúa con receptores opioides por lo que ejerce actividad analgésica, un 5% es eliminada en su forma desmetilada como normorfina. Su administración intratecal consigue altas concentraciones a las estructuras medulares y paramedulares con rapidez y con larga duración hasta 24 horas, siendo dosis muy inferiores a 1 a 5 mg, La vida media de eliminación de la morfina es aproximadamente de 120 minutos (Trescott et al., 2008). Sus efectos son antagonizados por la naloxona la cual desplaza a la morfina de sus sitios de unión (Feinberg et al., 1976; Snyder 2007; Van Ree et al., 2008).

Receptores opioides. Los receptores opioides, que son expresados desde los 2-5 días en las células nerviosas. (Kurt F. Hauser et al; Hauser y cols 2009), pertenecen al grupo de receptores de membrana asociados a proteínas G con siete segmentos transmembrana; las formas propuestas de receptor se denominaron según los agonistas prototipo utilizados: el receptor μ -opioide específico para la morfina y derivados, el

receptor κ , (de ketociclazocina) para dinorfina A y B y la α neoendorfina; y el receptor δ para explicar la acción de las encefalinas (Van Ree et al., 1999; Andrea M. Trescot et al., 2008), dichos mecanismos de acción fueron descritos con la existencia de la naloxona, un antagonista opioide no selectivo que revierte la inhibición provocada por agonistas opioides (Snyder, 2007); como consecuencia de su activación, se induce analgesia de elevada intensidad, producida principalmente en el SNC, así como otros efectos subjetivos que tienden a favorecer la instauración de una conducta de autoadministración denominada farmacodependencia (Noble and Cox, 1996).

Bupivacaína. Es un anestésico local del grupo de las aminoamidas con PM de 288 kDa deriva de la mepivacaína (origen de la cocaína), por sustitución de un radical metilo por un butilo, en el núcleo piperidina, la elevada liposolubilidad de la bupivacaína explica que sea cuatro veces más potente y tenga cinco veces más tiempo de acción que la lidocaína ya que se une a proteínas plasmáticas como la albúmina (Calatayud and González, 2003; Morgan and Maged 2002; Eledjam et al., 2007), su metabolismo se realiza por enzimas microsomales hepáticas que consisten en N-desalquilación, metilación, hidroxilación y conjugación con ácido glucurónico, la eliminación es principalmente por excreción urinaria (Krisko et al., 2003); la fracción libre de la bupivacaina es la responsable de las posibles reacciones tóxicas. Fisiológicamente, la bupivacaína se une a su receptor situado en la parte interna del canal del ion sodio cerca del axoplasma e inhibe la fosforilación de las cinasas reguladas por señales externas (extracellular signal-regulated kinase) (ERK) (Yanagitate and Strichartz, 2006), así, disminuye su permeabilidad al Ca^{++} y por tanto no afecta al potencial de reposo. En cambio, induce una reducción de la corriente de despolarización que no puede alcanzar el valor umbral, lo que causa bloqueo de la propagación del impulso eléctrico (Babst et al., 1978; Ready et al., 1985) reportaron que las dosis máxima de bupivacaina han sido establecidas en 150-225 mg cada 3 horas y 400 mg cada 24 horas. Después de un largo historial de uso clínico para anestesia espinal, se analiza su potencial neurotóxico, posterior a reportes de síndrome de cauda equina (SCE) y síntomas neurológicos transitorios (SNT), caracterizados por dolor, disestesia o ambos en glúteos, muslos o extremidades inferiores ocurridos después de la recuperación anestésica subaracnoidea (Hodgson et al., 1999), Un indicio tóxico de la bupivacaina es una posible respuesta vasodilatadora reducida (Babst et al., 1978). Julia Pollock (1998), señaló que la incidencia de trastornos neurológicos posteriores a la anestesia subaracnoidea es baja y varía de 0.01 y 0.03%.

Implicación de los receptores opioides en la diferenciación de neuronas y oligodendrocitos.

Estudios *in vitro* muestran que los opioides internos pueden inducir un retraso en la activación de oligodendrocitos en la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) (Zagon et al., 2009); pero la buprenorphine (agonista μ - y antagonista κ -opioide) tiene efectos estimuladores o inhibidores dosis dependiente sobre la mielinización en el SNC en embriones de ratas (Sanchez et al., 2008), otro estudio mostró que mediante la señalización de receptores μ - y δ -opioides se incrementa la proliferación de neuronas, pero disminuye el de astrocitos y oligodendrocitos de hipocampo de rata en cultivo (Persson et al., 2003); aún más, en un modelo knockout murino de receptores κ opioides se muestra que son necesarios para la maduración de oligodendrocitos en el SNC (Knapp et al., 2009), y ya diferenciados pierden la expresión de los receptores μ -opioides (Tryoen-toth et al., 2000), la morfina junto con la molécula gp120 del virus HIV pueden inducir toxicidad en oligodendrocitos (Kurt F. Hauser et al., 2009; Bao- Gang Liu BG et al., 2001) encuentran *in vitro*, que la bupivacaína causa inhibición de los canales de calcio de alto voltaje en neuronas del asta posterior de la médula espinal en ratas.

Compuestos opioides y patologías

Después de un largo historial de uso clínico de anestésicos locales para anestesia espinal, recientemente se analiza su potencial neurotóxico, posterior a reportes de síndrome de cauda equina (SCE), síntomas neurológicos transitorios (SNT), neuropatía periférica, caracterizados por dolor, disestesia o ambos en glúteos, muslos o extremidades inferiores ocurridos después de la recuperación anestésica subaracnoidea. Paraplejia. Por su parte, la solución hipotónica de Fentanyl provocó déficit permanente en la conducción nerviosa (Atanassoff P.G. and Bande, 2000; Hodgson et al., 1999; Brull et al., 2007), también se ha reportado toxicidad del SNC manifestada por adormecimiento perioral y de la lengua; convulsiones; falla respiratoria que puede terminar en coma; retención urinaria y alteraciones cardiovasculares por inyección intravascular accidental (Brodsky, 1985; Bao- Gang Liu et al., 2001).

Pensando en que las complicaciones neurológicas posteriores a la administración de anestésicos locales para bloqueos regionales periféricos o centrales siempre constituyen una posibilidad y considerando que la toxicidad se define como la capacidad de una sustancia de provocar una lesión, es prioridad de investigadores y clínicos, conocer y reconocer los alcances de nuestros procedimientos a favor de la seguridad de nuestros

pacientes. Por lo que en este trabajo se analiza el posible papel tóxico de los fármacos morfina, fentanyl y bupivacaína en neuronas y oligodendrocitos de rata wistar.

JUSTIFICACIÓN

La neurotoxicidad de los agentes anestésicos (bupivacaina, fentanyl y morfina) según referencias bibliográficas no se encuentra suficientemente clara a la fecha. Su empleo indiscriminado, a sabiendas de que en su composición no fueron hechos para utilización intratecal hace necesario el seguimiento de estudios que pongan su evidencia la probable toxicidad de los medicamentos, para crear concientización entre los anesthesiólogos de esta institución.

HIPOTESIS

HIPOTESIS VERDADERA

Los anestésicos bupivacaína hiperbárica, fentanyl y morfina aplicados a dosis de 1100 μM , 200 μM y 100 nM respectivamente; equivalentes a las aplicadas en humanos, tienen efectos tóxicos en los cultivos de neuronas de médula espinal y oligodendrocitos de nervio óptico obtenidos de ratas Wistar y Sprague Dawley respectivamente, por lo que inhibirán el crecimiento neuronal y disminuirán la producción de mielina respectivamente.

HIPOTESIS NULA

Los anestésicos bupivacaína hiperbárica, fentanyl y morfina aplicados a dosis farmacológicas equivalentes en humanos a dosis de 100 μM , 200 μM y 100 nM respectivamente, no tienen efectos tóxicos en los cultivos de neuronas y oligodendrocitos obtenidos de ratas Wistar y Sprague Dawley, por lo que no tendrán efecto alguno en el crecimiento neuronal y en la producción de mielina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos tóxicos (cambios morfológicos; modificación del crecimiento neuronal y producción de neurotubulos y mielina) de los anestésicos bupivacaína pesada, fentanyl y morfina, en modelos de cultivo de neuronas de médula espinal y oligodendrocitos de nervio óptico de ratas Sprague Dawley, a dosis equivalentes a las usadas en clínica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer el modelo de daño neuronal y oligodendroglial inducido por la sobreactivación de los receptores opiodes *in vitro*.
2. Determinar la ventana temporal de daño de los compuestos opiodes.

3. Investigar si los compuestos anestésicos (bupivacaína, fentanilo y morfina) modifican la morfología de las neuronas y oligodendrocitos *in vitro*.
4. Analizar si los compuestos opiodes (bupivacaína, fentanilo y morfina) inducen cambios en la expresión de proteínas del citoesqueleto de neuronas y oligodendrocitos.
5. Determinar si los compuestos anestésicos (bupivacaína, fentanilo y morfina) modifican la expresión de la proteína básica de la mielina en oligodendrocitos *in vitro*

TIPO DE ESTUDIO

Protocolo experimental basado en evidencias

DISEÑO

La investigación se realizará activamente mediante la búsqueda de información documental, recolección y obtención de reactivos que se detallan a continuación, instrumentos (tijeras, pinzas, estereoscopio, cajas de Petri, navajas, jeringas estériles) y animales necesarios (ratas de las cepas Sprague Dawley y Wistar) para la realización de los ensayos en los especímenes de estudio con las características requeridas en el laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

DEFINICIÓN DEL UNIVERSO

Población de estudio: Se harán estudios por cuádruple tomando en cuenta que cada ensayo consistirá de 6 ratas Sprague Dawley hembra preñadas de las cual se obtendrán los embriones para la obtención de las Neuronas de médula espinal, otro ensayo consistirá también por cuadruplicado tomando en cuenta que cada ensayo consistirá de 6 ratas Sprague Dawley preñadas de las cuales se obtendrán recién nacidos de 12 días de quienes se obtendrán oligodendrocitos del nervio óptico.

Aproximadamente serán 48 ratas Sprague Dawley madre como universo de trabajo.

De los embriones de ratas Sprague Dawley a los 14 días de gestación se obtendrán al menos 1 millón de neuronas para cultivarse en placas de 24 pozos estériles.

De los productos recién nacidos de 12 días Sprague Dawley, se obtendrán los nervios ópticos para cultivar al menos 500,000 oligodendrocitos en placas de 24 pozos estériles.

CRITERIOS

1. Criterios de inclusión: Ratas Sprague Dawley; embriones Sprague Dawley de 12-14 días de gestación; ratas recién nacidas Sprague Dawley de 12 días postparto.
2. Criterios de exclusión: Embriones de ratas Sprague Dawley de edad menor a 12 - 14 días de gestación.
3. Criterios de Eliminación: Enfermedad de las ratas preñadas Sprague Dawley, embriones de ratas Sprague Dawley de 12 - 14 días con malformaciones congénitas. Embriones con edad no aparente a la real.

MÉTODOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Tamaño de la muestra: Ensayos por cuádruple de cultivos de neuronas E14 y oligodendrocitos P12, asignándose un anestésico, por cada grupo de cultivos. Al primer grupo de cultivos se le administrará bupivacaína hiperbárica; al segundo se administrará fentanil y el tercero se administrará morfina y a un cuarto grupo se le administrará naloxóna y a un quinto grupo se le administrará solución fisiológica al 0.9% como grupo control.

DEFINICIÓN DE VARIABLE

VARIABLES INDEPENDIENTES

Dosis de los fármacos bupivacaína hiperbárica, fentanil y morfina.

VARIABLE DEPENDIENTE TIPO CUANTITATIVO

1. Morfología de la neurona: Tamaño de la neurona y número de las prolongaciones.
2. Síntesis de neurofilamentos.
3. Síntesis de mielina.
4. Viabilidad celular.

MATERIAL Y MÉTODOS:

CULTIVO CELULAR.

Cultivo primario de neuronas de médula espinal.

Animales: Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar (200 – 300 gr). Las ratas se mantuvieron aisladas en cajas (n = 10), con ciclos de 12.30/11.30 horas luz/oscuridad, temperatura constante de 24 °C, humedad de 55% y una alimentación a base de comida (Rodent Lab Chow) y agua, una semana antes de ser preñadas. Por medio de frotis vaginal se verificó la etapa estro (Marcondes et al., 2002.), posteriormente se apareó con el macho. Se realizó frotis vaginal a primera hora del día siguiente observando la presencia de espermatozoides. A los 14 días después de apareamiento fueron sacrificadas las ratas hembras por desnucamiento, se sujetaron de las patas y se limpió la piel del abdomen con etanol al 70%, posteriormente se disecó la pared abdominal, obteniendo el útero intacto, de donde se obtuvieron los embriones y se colocaron en caja Petri con buffer de fosfatos de sodio y potasio (DPBS 0.1 M) libre de calcio y magnesio, todo ello en hielo. Por medio de un estereoscopio, se colocó el feto de manera dorsal, con tijeras y pinzas finas se extrajo la médula espinal. (Campos et al., 2009). Las médulas se colocaron en una caja Petri con DPBS 0.1M, con tripsina 2.5% y DNAasa 0.4% se incubaron 10 minutos a 37°C, posteriormente se bloqueo la acción de la tripsina añadiendo medio neurobasal mas suero fetal de Bovino 10% (SFB), enseguida se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. El pellet celular obtenido se trituró suavemente con agujas de 21, 23 y 25 G durante 1 minuto, a continuación se filtró el homogenizado celular en un filtro de nylon en 40 µm con la finalidad de obtener el pellet celular libre de todo tejido conectivo y aglomerados de DNA roto. El sobrenadante se recolectó para el conteo celular, el cual se realizó mezclando en un microtubo Eppendorff 20 µl del pellet celular con 80 µl de medio Neurobasal B27 y 100 µl de azul trypan se homogenizó la mezcla, se tomaron 10 µl, los cuales se colocaron en la cámara de Neubauer para la realización del conteo de los 4 cuadrantes de la cámara. Finalmente las células se sembraron sobre placas de 24 pozos y sobre cubreobjetos previamente tratados con solución de poly-L-ornitina sembrando 200,000 y 50,000 neuronas respectivamente. Las células se mantuvieron en medio Neurobasal + SFB 10 % a 37 °C y 5 % CO₂, 24 h después de sembradas las células, el medio fue completamente aspirado y reemplazado por medio Neurobasal libre de SFB. Se cambiaron por 200 µl de medio Neurobasal + B27 cada 3 días.

Cultivo primario de oligodendrocitos de nervio óptico. Se obtuvieron de acuerdo a la metodología de (Ibarretxe et al., 2006). La siembra de células se realizó colocando 20 μ l de una suspensión celular con 200 000 células/ml en el centro del cubreobjetos en una caja Falcon para cultivo celular de 24 pozos, en seguida se incubó durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se añadieron 400 μ l de medio SATO por pozo. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C y 5% de CO₂ durante 2 días.

ENSAYOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR COMPUESTOS ANESTESICOS.

Agonista	Descripción	Concentración	Casa comercial
Sulfato de Morfina	Opioide agonista de receptores μ	100 μ M	Ampolleta de 10mg/10 mililitros (Pisa)
Fentanyl	Opioide agonista de receptores μ	0.1 η M	Ampolletas de 0.5 mg/10ml, (Janssen Cilag)
Bupivacaína	Derivado cocaínico agonista de receptores de canales de calcio	100 μ M	Ampolletas de 15mg/3 ml, (Pisa)
Naloxona	Inhibidor de receptores opioides	100 μ M	Ampolletas de 2 ml
Nalmefeno	inhibidor de receptores opioides	10-100 μ M	Ampolletas de 2mg/2ml

Tabla 1.- Tipo de fármacos analgésicos y las dosis empleadas en los experimentos de estimulación de neuronas y oligodendrocitos *in vitro*.

Cada fármaco se administró por separado a las placas de cultivo de 7 días *in vitro*, que fueron estimulados durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂. De estos se

realizaron estudios por triplicado en cada experimento al igual que el control, posteriormente se realizaron distintas pruebas enseguida descritas.

CUANTIFICACION DE LA VIABILIDAD CELULAR

Ensayo con MTT.

Cuantificacion de Viabilidad celular, Mediante la técnica de reducción de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide (MTT, Sigma), de acuerdo a (Ibarretxe et al., 2006 y Campos-Esparza MR, 2009).

Las células se incubaron con las sales de tetrazolio a concentración de 1 mg/ml durante una hora en el medio de cultivo, el precipitado de formazán se disolvió con dimetilsulfóxido (DMSO) y la absorbancia del sobrenadante se cuantificó a 570 nm, los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Graph Pad Prism para obtener los porcentajes de viabilidad celular así como la EC_{50} de cada agonista y antagonista. Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm SEM donde los experimentos (n=3) se realizaron por triplicas. La prueba de t de student (t) se realizó para comparar 2 condiciones experimentales y saber si eran estadísticamente significativos considerando un nivel de confianza de 0.95.

LOCALIZACION DE ANTIGENOS MEDIANTE INMUNOHISTOQUIMICA

La Inmunocitoquímica se realizó removiendo el cubreobjetos que contiene las neuronas o los oligodendrocitos de la placa de cultivo, en base a la técnica descrita por (Sánchez-Gómez et al., 2003), brevemente, se realizaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno, después se permeabilizaron las células con PBS + 0.2% de Tritón X100, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno con PBS 1x, se bloquearon los epítomos inespecíficos con PBS + 0.2% de Tritón X100 + 5% suero de caballo durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación las neuronas se incubaron con el Ab primario mouse anti-MAP2 (Sigma) (1 μ g/100 μ l) y los oligodendrocitos con mouse anti oligodendrocytes O4 (1 μ g/100 μ l) y mouse anti-Myelin Basic Protein tissue

culture supernatant (MBP) 1:100 en PBS+0.2% de Tritón X100 + BSA 5% durante 24 horas en cámara húmeda a 4° C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS+0.2% de Tritón X100 cada 10 minutos y 3 lavados cada 10 minutos con PBS. A continuación se incubó con el anticuerpo secundario goat anti-mouse fluorescein conjugated (Chemicon AQ303F) (0.33 µg/100µl) durante 1 hora diluido en PBS + 5% suero de caballo; se realizaron 3 lavados con PBS cada 10 minutos y se incubó con Hoechst 33258 (5 µg/ml) diluido en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente, finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS cada 10 minutos y se colocó sobre un portaobjetos y cubrió con Glycergel (Dako) (Campos-Esparza et al., 2009).

Para el análisis de las células viables se utilizó el microscopio de fluorescencia Axio Visión Release 4.6.3 SP1 Zeiss (2007). Para el análisis de las imágenes de Inmunofluorescencia se empleó el Image Pro Plus (Software) y Adobe Photoshop CS2.

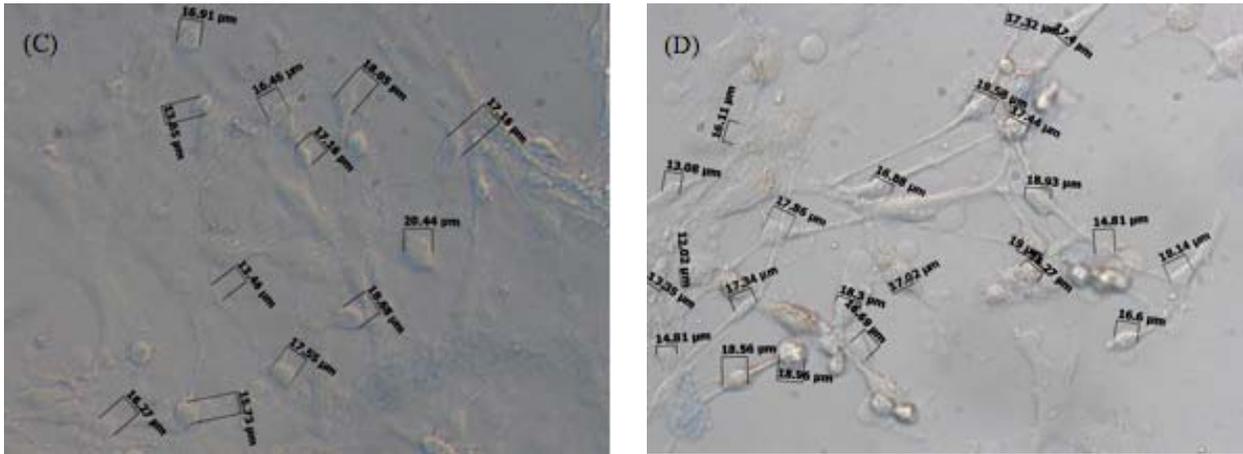
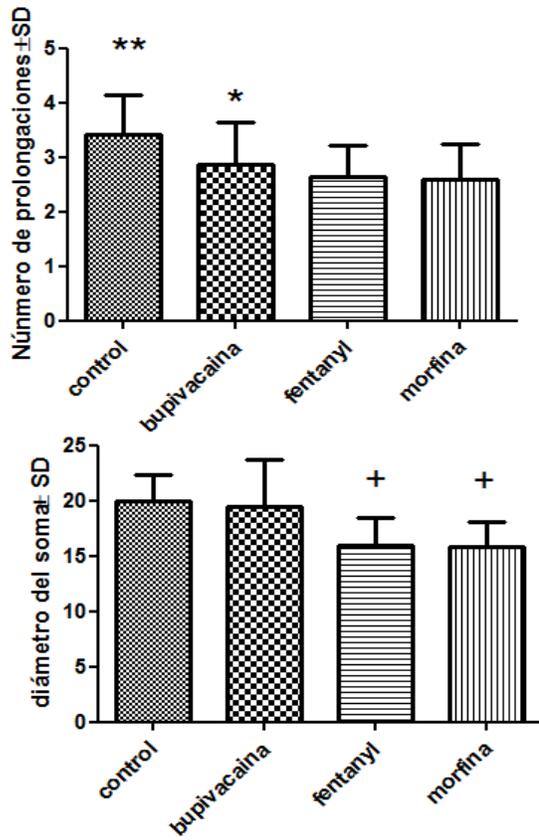


Figura 1. Cultivos de neuronas de médula espinal. (A) Cultivo normal o control; (B) Neuronas cultivadas por 24 h con bupivacaína 100 µM; (C) con Fentanyl a dosis de 0.1 µM; (D) con Morfina 1 mM.

En las gráficas 1A y 1B se muestran los valores de los diversos efectos de los fármacos, en general se observa que hubo cierta acción sobre el tamaño de las neuronas en cultivo, sobresale que la bupivacaína tuvo menor efecto observable, y los fármacos opioides fentanyl y morfina con mayor efecto inhibitor del crecimiento neuronal.

Gráfica 1B.- Número de prolongaciones neuronales **= $p < 0.05$

Gráfica 1A.- Diámetro de somas neuronal: += $p < 0.0001$



Efecto de los fármacos sobre las neuronas en la expresión de proteína asociada a microtúbulos (MAP2) mediante su detección con anticuerpos específicos.

Las células se estimularon por 24 h con bupivacaína, fentanyl, morfina y su antagonista naloxona. En la figura 2a se observa por inmunocitoquímica la expresión basal de la proteína asociada a microtúbulos (MAP2 verde Fig. 2), en neuronas cultivadas por 7 días, su distribución es visible en el soma y las prolongaciones neuronales inclusive donde se llevan a cabo las sinapsis (flechas); los núcleos se tiñeron de color azul por el colorante Hoechst. Se observa que la bupivacaína (Fig 2b) indujo sobre-expresión de dicha proteína, sugiriendo un efecto estimulante y que puede estar relacionado con su posible papel en la hiperexcitabilidad neuronal; Por otra parte, se detectó que el fentanyl y la morfina redujeron la expresión de MAP2, lo que correlaciona con la falta de diferenciación adecuada de las neuronas tomando como referencia el control (Figs. 2c y 2d)

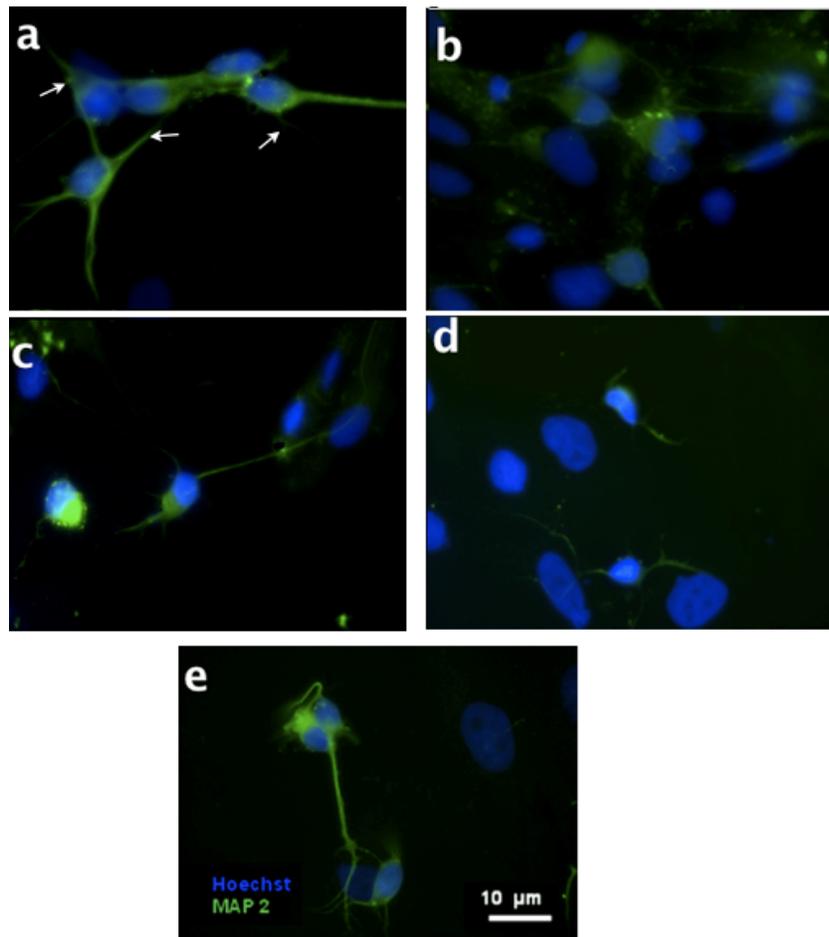
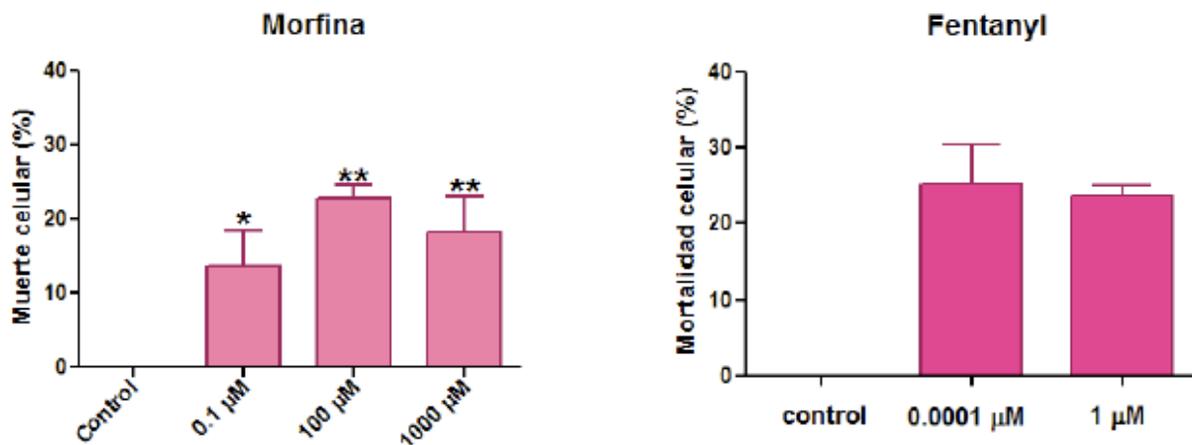


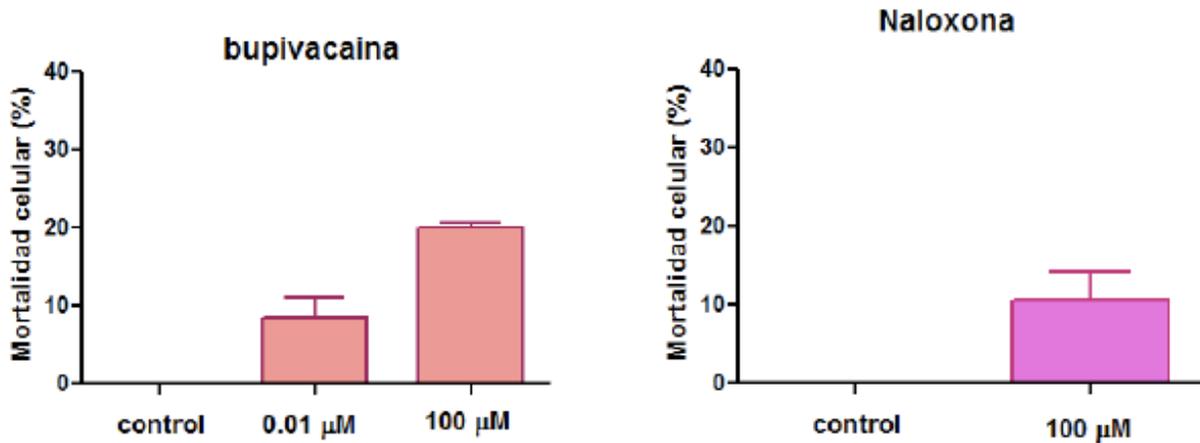
Figura 2. Cambios morfológicos en las neuronas inducidos por los fármacos bupivacaína 100 μM , Fentanyl 0.0001 μM , Morfina 100 μM y la Naloxona 100 μM . Aquí se observa la expresión normal de MAP2 en neuronas control (a) donde se observan sinapsis (flechas); y la sobre-expresión en las neurona tratadas con Bupivacaína (b), mientras que en el Fentanyl (c) y Morfina (d) la poca expresión de MAP2 se relaciona con una disminución en el tamaño de la neurona.

Dosis efecto de La morfina, fentanyl, bupivacaína y naloxona sobre la muerte neuronal a diferentes concentraciones.

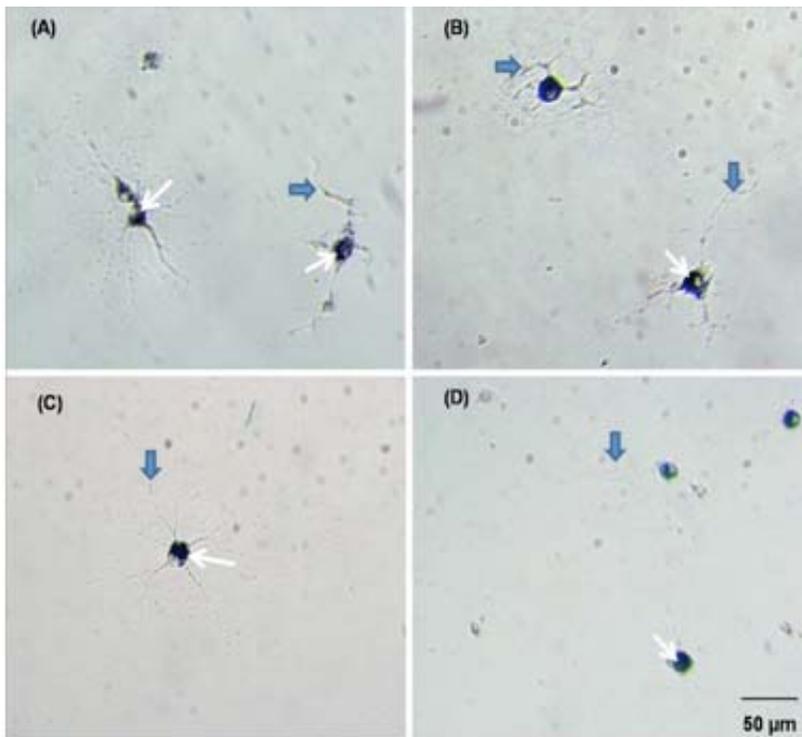
Las células se estimularon por 24 h con morfina, fentanyl, bupivacaína y su antagonista naloxona, mediante el ensayo de captación de sales de MTT y su reducción por la enzima succinato deshidrogenasa se detectó el porcentaje de mortalidad; que para la morfina a 100 μM fue del 22 % (Gráfica 2, morfina) para el Fentanyl a 0.0001 μM fue del 25%; (Gráfica 2, fentanyl) para la bupivacaína 100 μM tuvo efecto del 20% (Gráfica bupivacaína); finalmente la naloxona a la misma dosis de 100 μM tuvo un 10% de mortalidad sobre las neuronas (Gráfica 2 naloxona), por lo que podemos decir que el fentanyl fue el fármaco que a



dosis muy bajas tuvo un efecto sobre la mortalidad celular siendo dichas cantidades las concentraciones dosis–efecto, comparadas con el control.



Gráficas 2. efecto de fármacos en neuronas: Cultivo de neuronas de médula espinal y toxicidad



Oligodendrocitos marcados con MTT

La imagen muestra oligodendrocitos marcados con MTT post-estimulación con agonistas de los receptores opioides. (A) Control (B) Morfina 100 μM. (C) Fentanyl 1 μM. (D) Bupivacaina 10 nM. Las células presentaron diferencias morfológicas en el número de prolongaciones y en el índice de viabilidad con respecto al control.

mediada por el receptor opioide μ . En las gráficas se observa el control que son células estimuladas con

agua destilada, donde su viabilidad representa el 100 %, sin % de muerte, los valores de los compuestos opioides se calculan en base al control para calcular el % de muerte celular. En la anterior figura se muestra el porcentaje de activación de los receptores opioides en porcentaje, equivalente a la muerte neuronal, partiendo de n=3 por triplicado \pm 3 desviaciones estándar

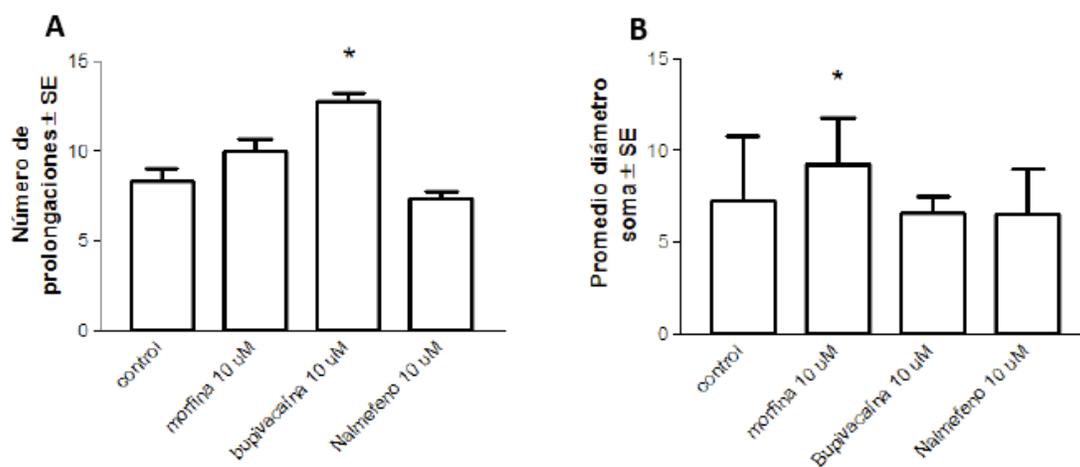
Figura 3

Se obtuvo un cultivo adecuado de oligodendrocitos

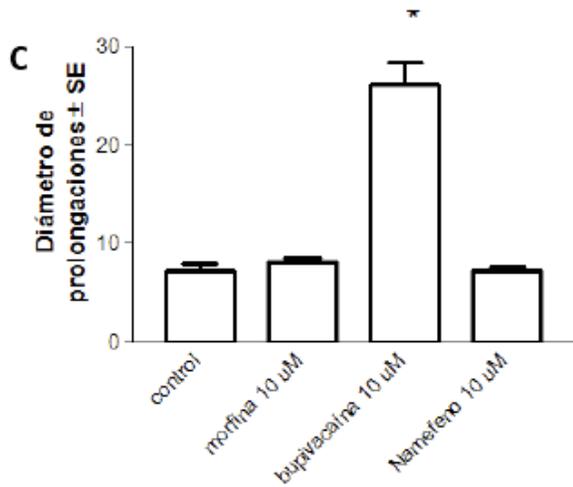
Los cultivos primarios de oligodendrocitos se obtuvieron y mantuvieron por al menos dos días en condiciones óptimas (figura 3a), se observaron oligodendrocitos aislados con cuerpos redondeados (flechas blancas en figuras 3a, 3b, 3c y 3d) y prolongaciones cortas (flechas azules en las mismas figuras) estas características son propias de éstas células en estudio.

Efecto de fármacos sobre la morfología celular.

A partir del cultivo primario con oligodendrocitos de 2 días in vitro, se realizaron un total de 5 experimentos por triplicado (n=3) los cuales fueron inducidos con los agonistas opioides (Morfina, Fentanyl y Bupivacaína) y el antagonista opioide (Naloxona) a diferentes concentraciones (Ver tabla 1) durante 24 horas; posteriormente se marcaron los oligodendrocitos que resultaron viables a la estimulación con MTT. Una vez teñidas las células con MTT, se realizó el conteo del número de prolongaciones, diámetro del cuerpo celular y diámetro de la extensión de las prolongaciones; todas las células viables que se observaron en cada uno de los pozos a 20X y se obtuvo las medidas de cada grupo de estimulación.



Así, se observó que los cultivos de oligodendrocitos control (Figura 4) presentaron un promedio de 7.5 prolongaciones por célula, sin embargo, las células estimuladas con bupivacaína presentaron mayor número de prolongaciones celulares con significancia estadística ($p < 0.0001$) (Gráfica 3A); por su parte, la morfina tuvo un efecto estimulador en el crecimiento de los somas (Figura 5), pues el promedio de los mismos frente al control fue mayor ($p < 0.05$) (Gráfica 3B); finalmente, la bupivacaína indujo un mayor diámetro de las prolongaciones de los oligodendrocitos (gráfica 3C) y (Figura 6).



Gráfica 3. Análisis del efecto de fármacos analgésicos en oligodendrocitos. A) Número de prolongaciones, la bupivacaína induce la formación de mas prolongaciones en oligodendrocitos ($p < 0.0001$); B) Se aprecia que la morfina induce un diámetro mas grande de los cuerpos de los oligodendrocitos ($P < 0.05$); C) resalta el efecto inductor de la bupivacaína en inducir un mayor diámetro de las prolongaciones en oligodendrocitos ($p < 0.0001$).



Figura 4. Medidas de cuerpo y prolongaciones de oligodendrocito control.

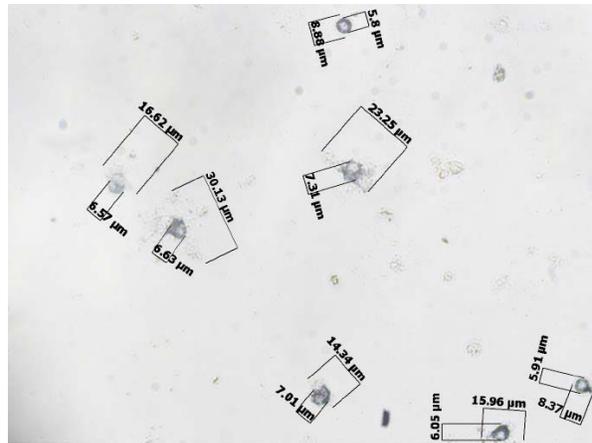


Figura 5.- Medidas de cuerpo y prolongaciones de oligodendrocitos tratados con morfina 10 μM.

Viabilidad de oligodendrocitos inducida por fármacos.

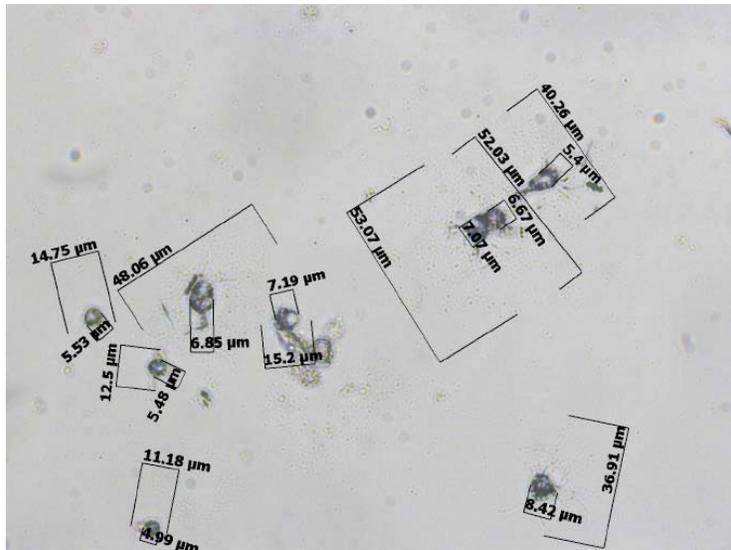


Figura 6.- Medidas de cuerpo y prolongaciones de oligodendrocitos estimulados con bupivacaína 10 μ M.

El promedio del número de células viables observadas mediante su tinción con MTT en el control negativo se consideró como el 100%

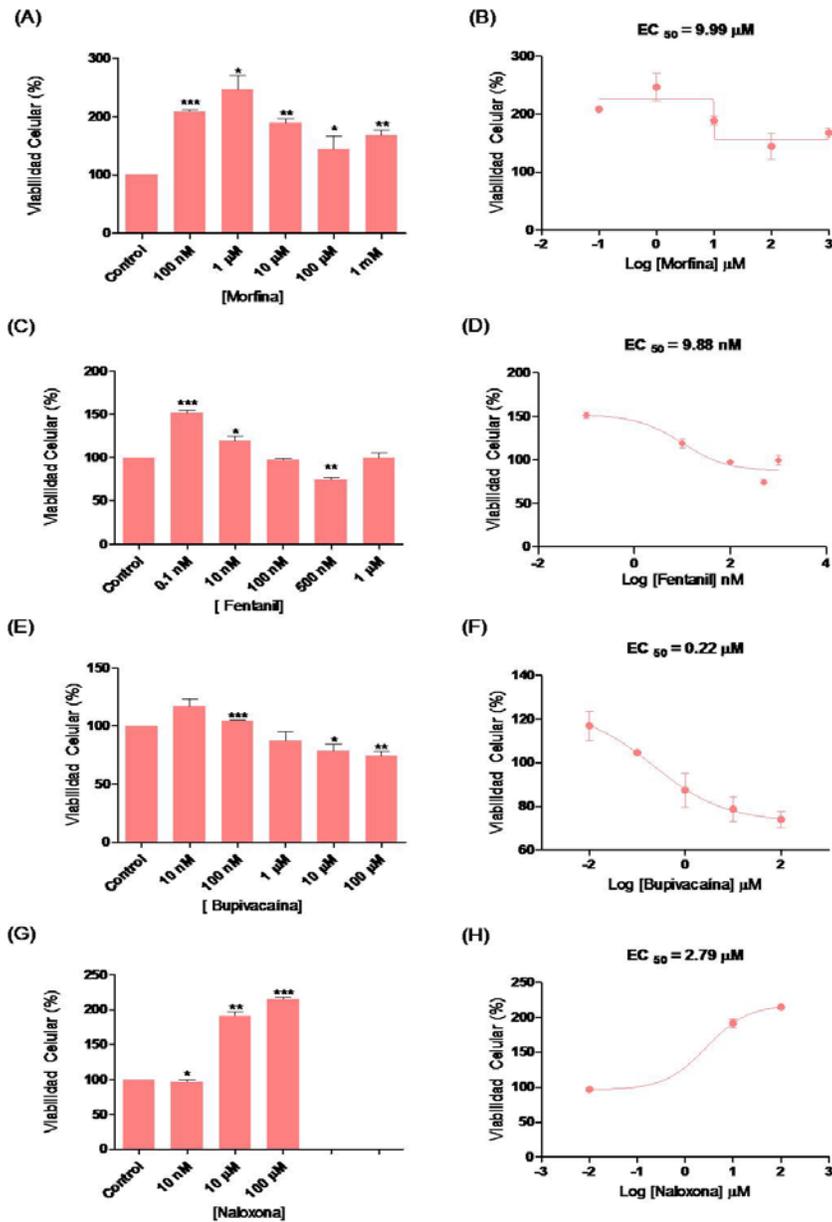
de viabilidad y en base a ésta, se obtuvo la viabilidad de los pozos estimulados con agonistas

Los resultados obtenidos mostraron que los oligodendrocitos aumentaron su viabilidad en la mayoría de los casos (Figura 3). Las células que fueron inducidas con morfina (1 μ M) (figura 3A) mostraron una viabilidad celular de $247.10 \pm 24.10\%$ con respecto al control (100% viabilidad celular) (Gráfica 4A).

Con fentanyl a una concentración de 0.1 nM, la viabilidad celular de los oligodendrocitos se vio afectada de manera positiva con respecto al control, dando una viabilidad de $151.200 \pm 3.217\%$. Así mismo, se observó que conforme aumenta la concentración del opioide, la viabilidad de los oligodendrocitos disminuye hasta un $74.31\% \pm 3.155\%$ a la concentración de 500 nM (Gráfica 4C).

Con Bupivacaína se encontró que a concentración de 10 nM la viabilidad aumentó hasta un $116.90 \pm 6.669\%$ con respecto al control y conforme se aumentó la concentración la viabilidad celular se vio disminuida hasta $74.09 \pm 3.710\%$ como se observa en la concentración de 100 μ M (Gráfica 4E).

Con el antagonista Naloxona, se observó un comportamiento contrario al analizado en los experimentos anteriores con los agonistas. En este caso, conforme aumentó la concentración del antagonista desde 10 nM hasta 100 μ M, la viabilidad aumentó hasta un $214.500 \pm 3.819\%$ (100 μ M) (Gráfica 4G).



Grafica 4. Los cultivos de oligodendrocitos de 2 días in vitro fueron estimulados durante 24 horas con diferentes agonistas, la viabilidad celular se determinó post-estimulación con el método del MTT. Cuantificando el número de células teñidas en un microscopio óptico (A, C, E, G). Las gráficas (E, F, G, H) representan la EC_{50} de cada agonista. Representaciones cuantitativas de la viabilidad celular (%) de los oligodendrocitos con respecto al control (100%), oligodendrocitos sin estimulación toxicológica. Los valores de cada barra representan la media \pm SEM de 5 experimentos realizados por triplicado (n=3) bajo las mismas condiciones. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con una prueba de T – Student.

Resultados utilizando la técnica de Inmunocitoquímica para observar la morfología de oligodendrocitos.

A los oligodendrocitos incubados con los agonistas opioides y cocainico se aplicó un anticuerpo dirigido a la molécula O4 específica de éstas células y su presencia se identificó mediante inmunofluorescencia, los núcleos se identificaron con Hoechst. Se observó que las células incubadas con morfina expresaron poca cantidad de O4, sugiriendo que este opioide tiene un efecto inhibitorio en la síntesis de esta molécula de forma similar a la bupivacaína; por su parte, el fentanyl y la naloxona no tuvieron el mismo efecto, ya que la tinción fue muy similar al control (figura 7A, 7C y 7E).

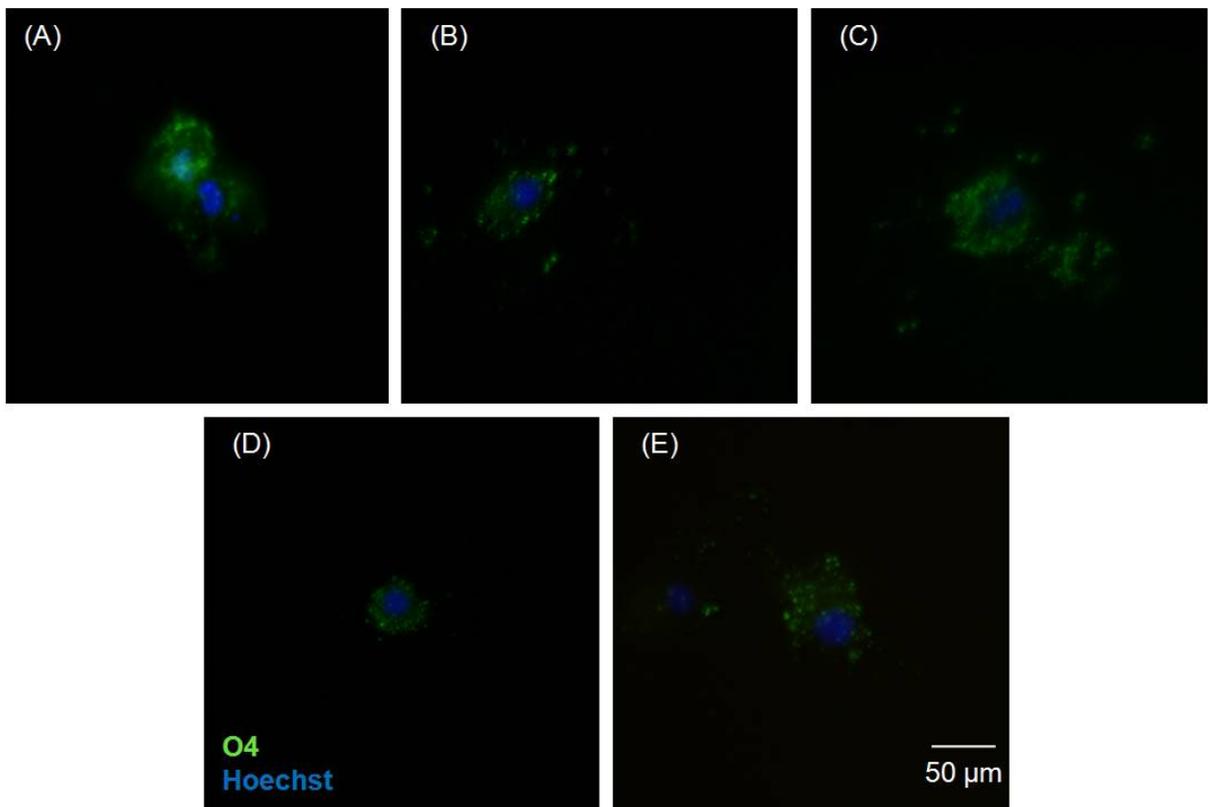


Figura 7.- oligodendrocitos teñidos para la presencia de O4 (molécula específica de éstas células). Oligodendrocitos de 2 días de in vitro estimulados durante 24 h con agonistas de los receptores opioides. Posteriormente fueron marcados con un Ab anti- O4 unido a una molécula conjugada con fluorocromo (verde). El núcleo fue marcado con Hoechst 33258 (azul). (A) Control. (B) Morfina (1 mM). (C) Fentanyl (1 μ M). (D) Bupivacaína (10 nM). (E) Naloxona (100 μ M). Barra de calibración 30 μ m.

Con la misma técnica de inmunohistoquímica se identificó la expresión de la proteína básica de mielina (Figura 8), observando que las células que fueron estimuladas con morfina emiten una mayor intensidad de fluoresceína, hallazgo que nos sugiere que este compuesto opioide modifica la expresión de MBP en los oligodendrocitos, el punto de vista cualitativo. Por otro lado, con bupivacaína y fentanyl se observó una fluorescencia igual emitida con respecto al control, lo anterior sugiere que el fármaco opioide morfina induce un estado de activación en la producción de esta proteína constituyente de la mielina.

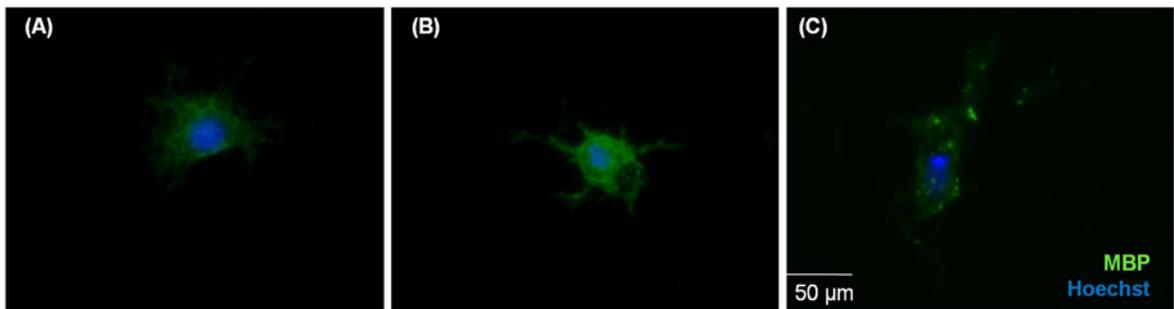


Figura 8.- Oligodendrocitos de 2 días in vitro estimulados durante 24 h con agonistas de los receptores opioides. Las células fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-MBP (verde). El núcleo fue marcado con Hoechst 33258 (azul). (A) Control Negativo. (B) Morfina (1 mM). (C) Fentanyl (1 µM). Barra de calibración 50 µm.

DISCUSION

Fármacos:

Sulfato de morfina. Sabiendo que la dosis para humanos de este fármaco opioide es de 100 a 200 microgramos, se emplearon dosis equivalentes de 0.1 uM a 1000 uM; de igual manera, el fentanyl se usa para humanos a dosis de 1 a 2 microgramos por 100 gr de peso (Wong y cols, 2010) y en este trabajo se utilizaron dosis equivalentes de 100 nM y 1 mM de fentanyl, presentación 0.5 mg/10ml, (Janssen Cilag); A su vez, la dosis en humanos de Bupivacaína es de 25 a 50 µg (presentación 15mg/3 ml, (Pisa)) (Besocke y cols, 2007), se usaron dosis equivalentes de 0.1 nM a 1 µM, cada fármaco se administró por separado a las placas de cultivo de 7 días in vitro, que fueron estimulados durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂. Naloxona dosis en humanos 0.4mg por dosis, usando dosis equivalente de 100 µM - 10 nM. De tal manera que las dosis empleadas han sido utilizadas por otros investigadores para estudios in vitro (Babst y cols., 1978; Besocke y cols., 2007; y cols., 2010).

En relación al fentanyl en neuronas de rebanadas de tallo cerebral en ratas se determinó que a concentraciones clínicas relevantes de 0.25 a 1 pMol/L, produce un aumento del potencial de acción y aumenta la frecuencia del impulso eléctrico, probablemente inhibiendo la función neuronal de las interneuronas gabaérgicas, que suprimen la actividad de las neuronas de la médula espinal. El fentanyl es un para-agonista selectivo que activa los receptores opioides, quizá este mecanismo lo observamos en nuestros ensayos in vitro en neuronas de médula espinal de fetos de rata (gráfica 2), pues en ensayos de mortalidad celular, esta fue mayor en las neuronas control, lo que sugiere que el fentanyl tiene un efecto estimulador a través de sus receptores µ-opioides que puede explicar el posible efecto tóxico que se presenta en algunos casos clínicos mediante su metabolismo hepático (Otha y cols., 1995; Armstrong y cols., 2009) o al dejar prurito intenso como secuela en pacientes obstétricas (Wells y cols., 2004).

La morfina se usa normalmente a 0.1-0.2 mg pero puede producir efectos contralaterales como prurito, nauseas, vomito y depresión respiratoria de una manera dosis dependiente (Gallagher, 1997). La morfina tiene buena

hidrosolubilidad que le permite ser utilizada en solución por todas las vías de administración posibles y se elimina preferentemente por glucuronidación en posición 3 ó 6, siendo su principal metabolito la morfina 3 glucurónido, en cambio la morfina 6 glucurónido interactúa con receptores opioides por lo que ejerce actividad analgésica, un 5% es eliminada en su forma desmetilada como normorfina. Su administración intratecal consigue altas concentraciones a las estructuras medulares y paramedulares con rapidez y con larga duración hasta 24 horas, siendo dosis muy inferiores a 1 a 5 mg, La vida media de eliminación de la morfina es aproximadamente de 120 minutos (Trescott y cols., 2008). Sus efectos son antagonizados por la naloxona la cual desplaza a la morfina de sus sitios de unión (Feinberg y cols., 1976; Snyder, 2007; Van Ree y cols., 2008).

Se hizo un estudio retrospectivo en expedientes de pacientes operados y se buscaron Seis "complicaciones graves": Paro cardíaco (ausencia de respiración espontánea, ausencia de pulso palpable) que requiere masaje cardíaco o la adrenalina, Crisis convulsivas, Radiculopatía, Síndrome de la cola de caballo, Paraplejía y La muerte. (Auroy y cols., 1997).

La morfina tiene un doble efecto en la respuesta nociva inhibidora y facilitadora dependiendo de la dosis administrada (Otha y cols., 1995). Esto se pudo corroborar en nuestros experimentos donde la morfina a dosis bajas como 100 μ M y fentanyl a 0.0001 μ M aplicadas por nosotros en los cultivos de neuronas de médula espinal de rata Wistar, indujeron una disminución en el diámetro del cuerpo de las neuronas y del número de sus prolongaciones (gráficas 1A y 1B), el efecto inhibitor de la morfina y fentanyl se mostró también por la inhibición de la expresión de MAP2, esta proteína asociada a microtúbulos es indispensable para el tráfico vesicular, plasticidad neuronal y disponibilidad de receptores en las neuronas (Farah y Leclerc, 2008), lo que explica una de las múltiples vías por las que puede estar actuando la morfina. Otros investigadores han descubierto que la administración crónica de morfina a ratas también modifica in situ la expresión de MAP2 en neuronas del núcleo accumbens y le adjudican a esto, parte de los mecanismos fisiopatológicos de la morfina en el cerebro de las ratas estudiadas ([Hemby SE., 2004](#)). Por el contrario, no se ha descrito en la literatura alguna relación del efecto del fentanyl con la expresión de MAP2 en neuronas, por lo que podemos expresar

que este fármaco opioide sintético puede dañar al citoesqueleto de las neuronas mediante la inhibición de la expresión de MAP2. En relación al efecto de la bupivacaína, es interesante mencionar que a la dosis usada por nosotros in vitro (0.01 y 100 μ M) indujo una sobre-expresión de MAP2, lo que puede explicar la sobre-excitación neuronal en algunos casos de secuelas por su aplicación intratecal manifestada por parestesias hasta de dos semanas posterior a su aplicación (Horlocker y cols., 1997).

El aumento de las concentraciones de glutamato en el microdializado de líquido cefalorraquídeo puede ser otra pista importante en la causa de neurotoxicidad por anestésicos locales por vía espinal, a éste respecto Yamashita y cols.,(2003) realizaron un estudio comparativo entre bupivacaina al 2%, tetracaina al 2%, lidocaina al 2% y ropivacaina al 2% administradas por medio de un catéter subaracnoideo dirigido hacia la cauda equina, se encontró que todos los anestésicos locales provocaron un aumento significativo en la concentración de glutamato en el microdializado de LCR sin diferencia entre ellos, el grupo que recibió lidocaína tuvo peor evaluación sensitiva que los demás grupos. En lo referente a los hallazgos histopatológicos, se encontró vacuolización de la sustancia blanca del funículo dorsal principalmente en el grupo de lidocaína. Yamamoto, le confiere un papel fundamental en la citotoxicidad del anestésico a los radicales libres de oxígeno, los cuales inhiben la alta afinidad sodio-dependiente en la recaptura de glutamato por células gliales (Yamamoto y cols., 1998). Liu y cols., (2001), también demuestran que la bupivacaína inhibe los canales de calcio de alto voltaje en neuronas de asta dorsal de la rata dosis dependiente.

Otras posibles causas de daño neurológico ajenas a los fármacos son: manejo del paciente, tipo punción, isquemia neural, distribución anómala del anestésico, espasmo muscular, dolor miofacial y la adición de glucosa a las soluciones anestésicas para otorgar determinada baricidad con respecto al LCR (Hampl y cols., 1999, Pollock y cols., 1999; Beardsley y cols., 1995).

La existencia de un fenómeno paradójico de hiperalgesia inducida por opioides y la relativa aparición de tolerancia está siendo reconocida hoy día con más frecuencia en anestesia y en la terapia del dolor crónico; por tanto, el empleo de esta clase de droga puede estar asociado no solo a pérdida de la eficacia

analgésica (tolerancia) sino también a la activación de mecanismos pronociceptivos que incrementan la sensibilidad al dolor (hiperalgesia). Tres mecanismos mayores parecen estar implicados (Redondo y col. 2006).

- ✓ Activación del sistema glutaminérgico central.
- ✓ Liberación de dinorfina espinal (sustancia hiperalgésica)
- ✓ Facilitación espinal descendiente a través de células sensibles a opioides situadas en la médula rostral ventromedial.

Estas evidencias indirectas soportan que los opioides pueden causar hiperalgesia y a su vez pueden tener un impacto negativo en los resultados finales perioperatorios (Redondo y cols., 2006).

Oligodendrocitos. Cuando aplicamos morfina en oligodendrocitos de rata, se mostró sobreexpresión de Proteína Básica de la mielina (MBP) (figura 8) y aumento de diámetro del soma (Gráfica 3B y figura 5), mientras que fentanyl y bupivacaína no tuvieron efectos. La MBP es una proteína fundamental en la estructura de la mielina producida por los oligodendrocitos en el SNC y su relación con las neuronas a quienes les forma una capa aislante y protectora (Fitzner y cols., 2006), éstas células son importantes en la estructura y fisiología del Sistema Nervioso, por lo que pueden ser blanco de los fármacos analgésicos opioides durante su administración intratecal, en efecto, estudios en modelos animales tratados con morfina, mostraron que en forma concomitante con la administración de proteínas del virus HIV, tienen un efecto estimulador sobre oligodendrocitos de rata, probablemente induciendo un aumento en su ciclo de recambio, lo anterior se relaciona con un progresivo daño del sistema Nervioso Central en personas que son adictas a la morfina y al mismo tiempo son seropositivas al VIH (Hauser y cols., 2009), en otro estudio se detectó reducción en la expresión de genes de la MBP en muestras post-mortem de núcleo accumbens de adictos a la cocaína (Albertson y cols., 2004; Miguel-Hidalgo, 2009), estos reportes sustentan nuestros hallazgos de que la morfina induce cambios morfológicos en los oligodendrocitos que puede explicar los efectos dañinos encontrados en pacientes a quienes se les ha administrado este fármaco opioide.

Otro marcador durante la diferenciación de oligodendrocitos es la molécula O4 (Takumoto y cols., 2010), esta molécula la consideramos como un marcador específico para oligodendrocitos y aplicamos anticuerpos específicos para su identificación en los experimentos de estimulación in vitro de oligodendrocitos con morfina, fentanyl, bupivacaína y naloxona. Observamos que morfina y bupivacaína inhibieron la expresión de O4, mientras que fentanyl y naloxona no modificaron su expresión. Los resultados anteriores muestran que la morfina y bupivacaína in vitro, pueden inducir cambios en los oligodendrocitos y eventualmente inducir alteraciones en su desarrollo y función, no tenemos parámetros de la literatura para poder discutir nuestros hallazgos.

En forma general, los fármacos estudiados ejercieron un efecto estimulador sobre los oligodendrocitos, pues la sobrevivencia fue mayor cuando las células estuvieron en contacto con los agonistas opioides y cocaínico comparado con el control (gráfica 4).

Para los pacientes con dolor moderado a severo, la administración parenteral de opioides es el tratamiento más común. El efecto analgésico también es dosis-dependiente, es por ello que resulta esencial que la dosis y el esquema de administración sea individualizado para cada paciente. En general la mayoría de los analgésicos opioides son similares en sus características, excepto por las variaciones en la potencia y vida media (Sánchez, 2004).

Las complicaciones neurológicas posteriores a la administración de anestésicos locales para bloqueos regionales periféricos o centrales siempre constituyen una posibilidad. Considerando, que la toxicidad se define, como la capacidad de una sustancia de provocar una lesión, es prioridad de investigadores y clínicos, conocer y reconocer los alcances de nuestros procedimientos a favor de la seguridad de nuestros pacientes.

Aunque estudios experimentales en animales han aportado una importante evidencia de que los anestésicos locales usados a concentraciones importantes pueden causar lesión al tejido neural, los mecanismos fisiopatológicos aun hoy en día parecen poco claros.

Los efectos de los anestésicos locales sobre el flujo espinal medular según los hallazgos de Ida y cols., (1997); y Porter y cols., (1985) donde éstos fármacos (lidocaína, bupivacaína, tetracaína y mepivacaína) sin la adición de adrenalina parecen tener un efecto esencialmente vasodilatador e incremento en flujo sanguíneo local, sin embargo, la ropivacaína produce vasoconstricción y disminución importante del flujo sanguíneo medular dosis dependiente.

Complicaciones. Los agonistas opiáceos producen paraparesia espástica después de un corto periodo de isquemia de la médula espinal en ratas a través de los receptores mu y delta, la espasticidad provocada por agonistas opiáceos DAMGO y DPDPE se revirtió completamente con tratamiento intratecal de naloxona y naltrindole. (Kakinohana y cols., 2006).

CONCLUSIONES.

Morfina y Fentanyl inhiben la expresión de MAP2 y el desarrollo morfológico de neuronas de médula espinal de fetos de 14 días de rata Wistar; Bupivacaína estimula la expresión de MAP2.

En forma general, los fármacos opioides analizados son estimulantes de la viabilidad celular para las neuronas en cultivo.

Morfina estimula la expresión de MBP en oligodendrocitos de nervio óptico de ratas Wistar recién nacidas, por lo que induce su diferenciación celular por disminución de expresión de las moléculas O4.

Fentanyl y naloxona al parecer no tienen efecto sobre la expresión de O4.

ANEXOS

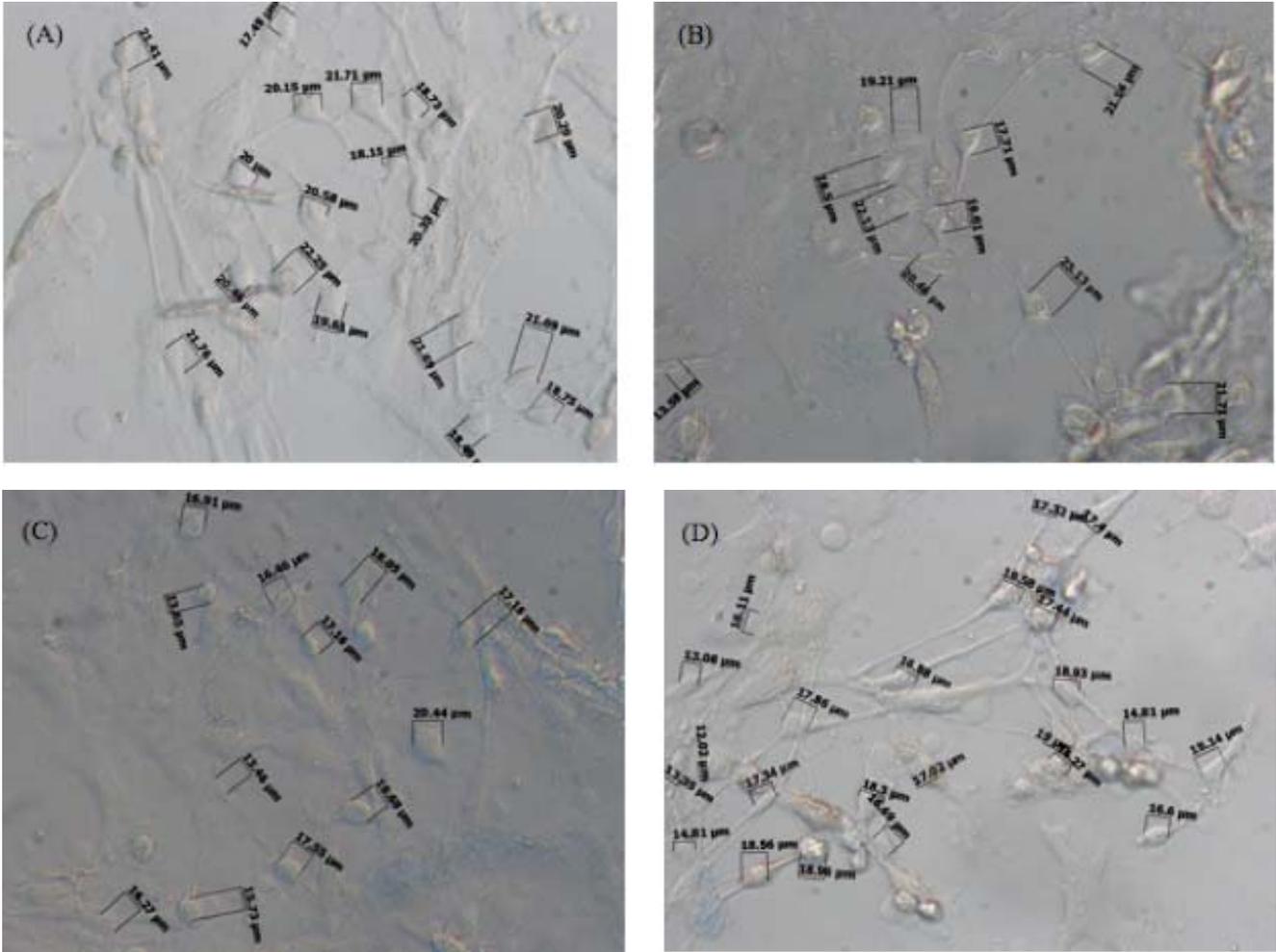
Agonista	Descripción	Concentración	Casa comercial
Sulfato de Morfina	Opioide agonista de receptores μ	100 μ M	Ampolleta de 10mg/10 mililitros (Pisa)
Fentanyl	Opioide agonista de receptores μ	0.1 η M	Ampolletas de 0.5 mg/10ml, (Janssen Cilag)
Bupivacaína	Derivado cocaínico agonista de receptores de canales de calcio	100 μ M	Ampolletas de 15mg/3 ml, (Pisa)
Naloxona	Inhibidor de receptores opioides	100 μ M	Ampolletas de 2 ml

Tabla 1.- Tipo de fármacos analgésicos y las dosis empleadas en los experimentos de estimulación de neuronas y oligodendrocitos *in vitro*.

Análisis	Control	bupivacaína	Fentanyl	Morfina
Numero de valores	100	54	100	74
Promedio	3.420	2.870	2.630	2.595
Desviación standard	0.7132	0.7782	0.5801	0.6393
Error standard	0.07132	0.1059	0.05801	0.07432

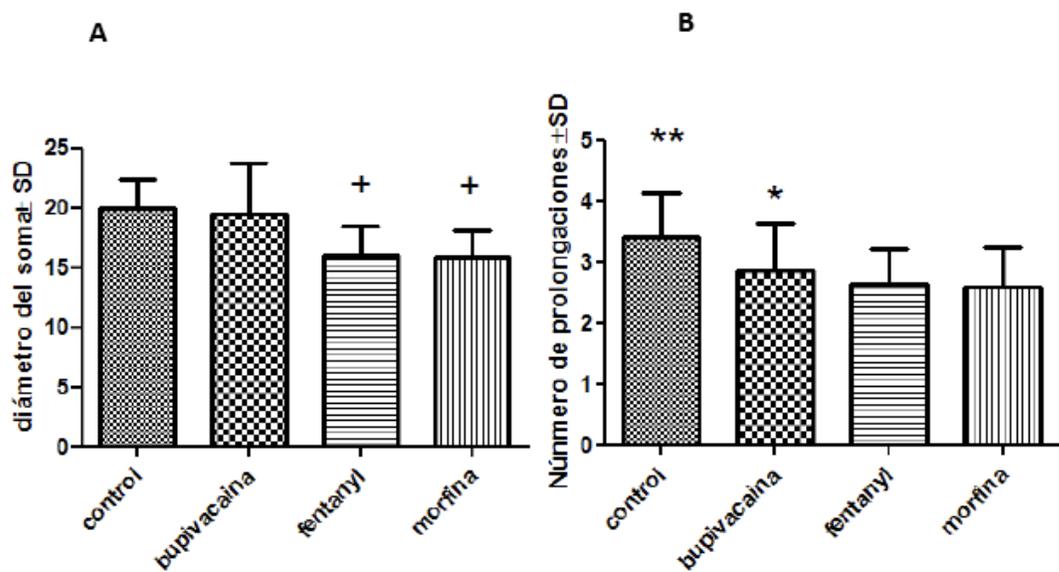
Tabla 2.- Morfología de las neuronas. El diámetro de los cuerpos neuronales control fue significativamente mayor con respecto a los tratados con bupivacaína, fentanyl y morfina ($p < 0.0001$); mientras que las neuronas tratadas con bupivacaína tuvieron el diámetro mayor ($p < 0.05$) con respecto a las tratadas con los fármacos opioides.

Figura 1. Cultivos de neuronas de médula espinal. (A) Cultivo normal o control; (B) Neuronas cultivadas por 24 h con bupivacaína 100 μ M; (C) con Fentanyl a dosis de 0.1 η M; (D) con Morfina 1



mM.

Gráfica 1A. Diámetro del soma neuronal: $+p < 0.0001$;



Gráfica 1B. Numero de prolongaciones neuronales: **= $p < 0.0001$; *= $p < 0.05$

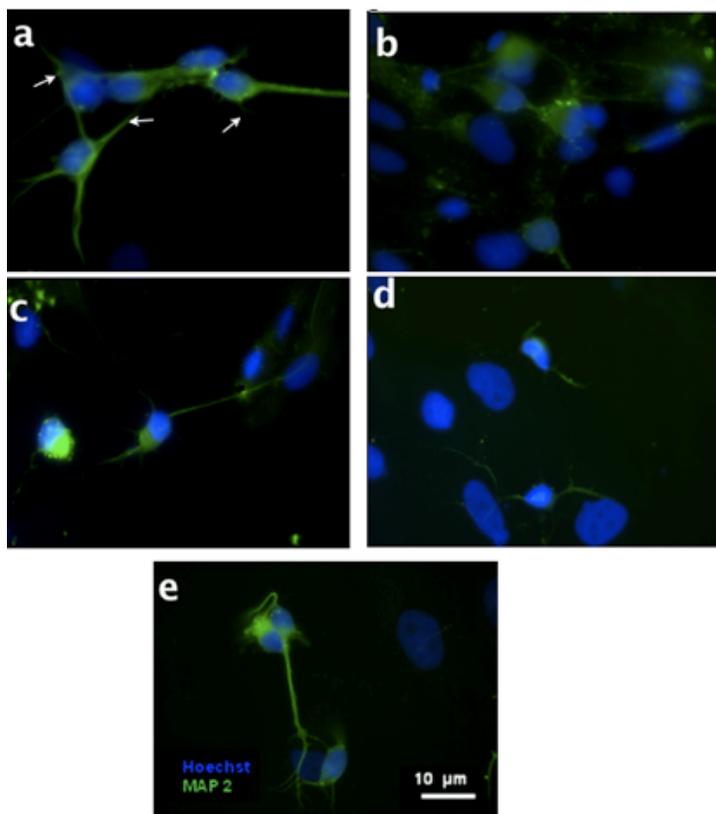
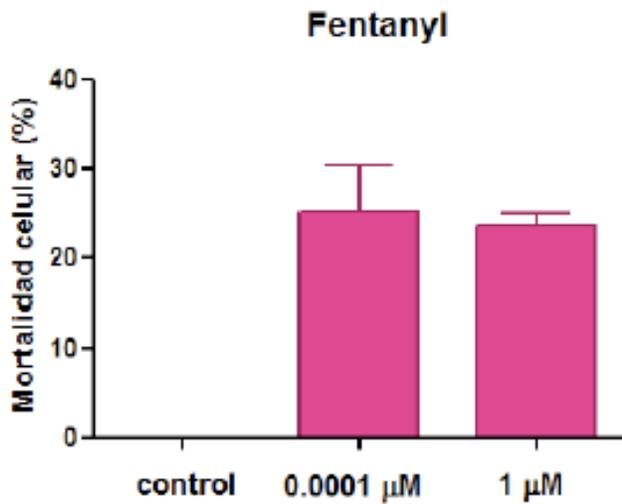
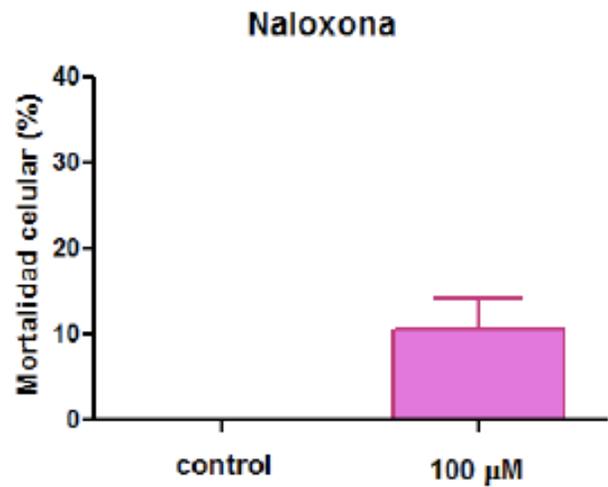
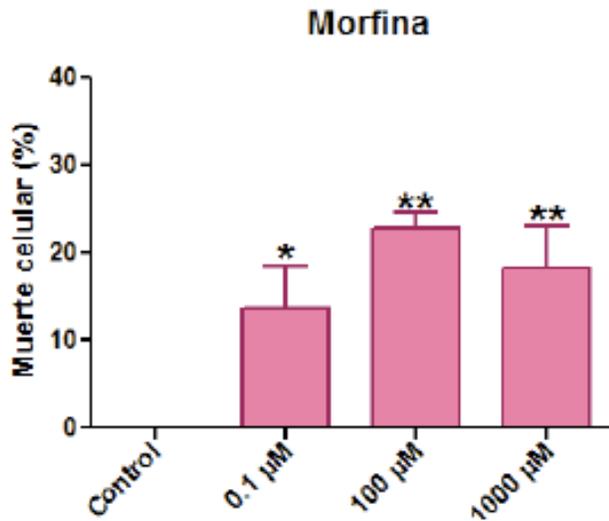


Figura 2. Cambios morfológicos en las neuronas inducidos por los fármacos bupivacaína 100 μM , Fentanyl 0.0001 μM , Morfina 100 μM y la Naloxona 100 μM . Aquí se observa la expresión normal de MAP2 en neuronas control (a) donde se observan sinapsis (flechas); y la sobre-expresión en las neurona tratadas con Bupivacaína (b), mientras que en el Fentanyl (c) y Morfina (d) la poca expresión de MAP2 se relaciona con una disminución en el tamaño de la neurona.

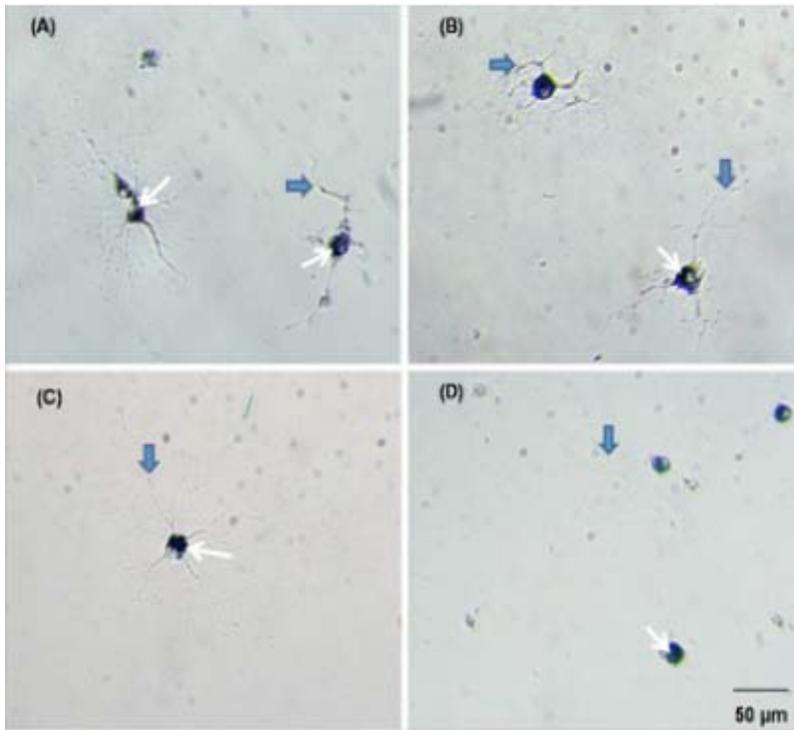


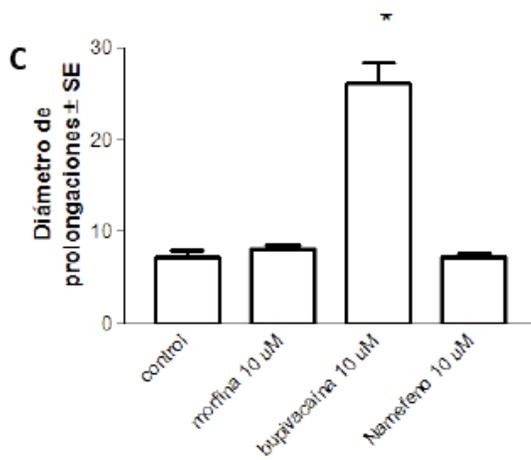
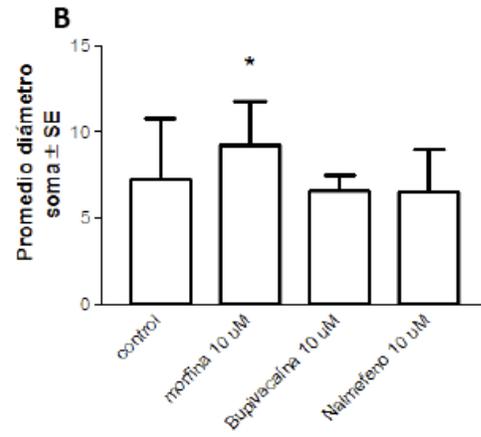
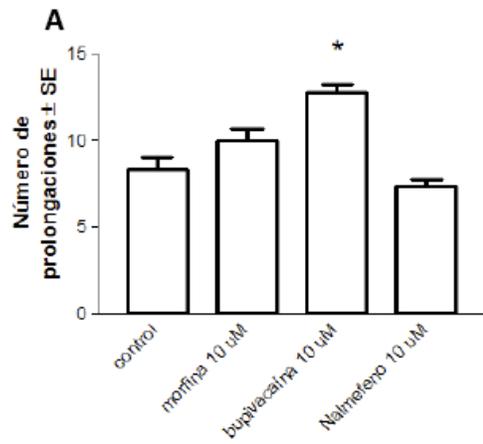
Gráficas 2. efecto de fármacos en neuronas: Cultivo de neuronas de médula espinal y toxicidad mediada por el receptor opioide μ . En las gráficas se observa el control que son células estimuladas con agua destilada, donde

su viabilidad representa el 100 %, sin % de muerte, los valores de los compuestos opioides se calculan en base al control para calcular el % de muerte celular. En la anterior figura se muestra el porcentaje de activación de los receptores opioides en porcentaje, equivalente a la muerte neuronal, partiendo de $n=3$ por triplicado ± 3 desviaciones estándar

Oligodendrocitos marcados con MTT

La imagen muestra oligodendrocitos marcados con MTT post-estimulación con agonistas de los receptores opioides. (A) Control (B) Morfina 100 μ M. (C) Fentanyl 1 μ M. (D) Bupivacaína 10 nM. Las células presentaron diferencias morfológicas en el número de prolongaciones y en el índice de viabilidad con respecto al control.





Gráfica 3. Análisis del efecto de fármacos analgésicos en oligodendrocitos. A) Número de prolongaciones, la bupivacaína induce la formación de mas prolongaciones en oligodendrocitos ($p < 0.0001$); B) Se aprecia que morfina induce un diámetro mas grande de los cuerpos de los oligodendrocitos ($P < 0.05$); C) resalta el efecto inductor de la bupivacaína en inducir un mayor diámetro de las prolongaciones

la

en oligodendrocitos ($p < 0.0001$).

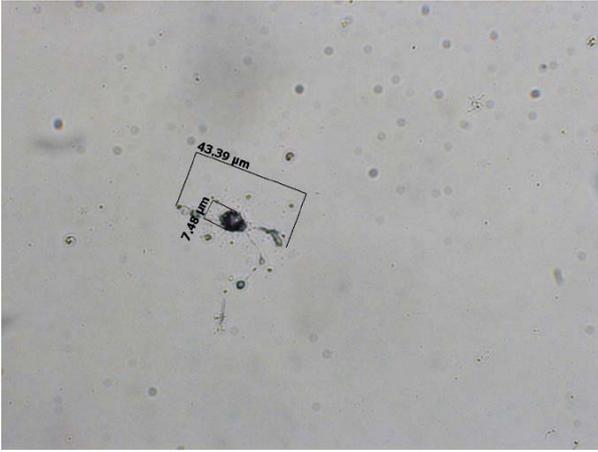


Figura 4. Medidas de cuerpo y prolongaciones de oligodendrocito control.

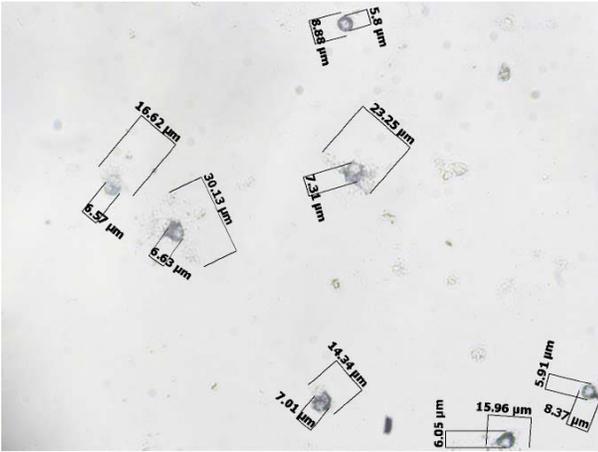


Figura 5.- Medidas de cuerpo y prolongaciones de oligodendrocitos tratados con morfina 10 uM.

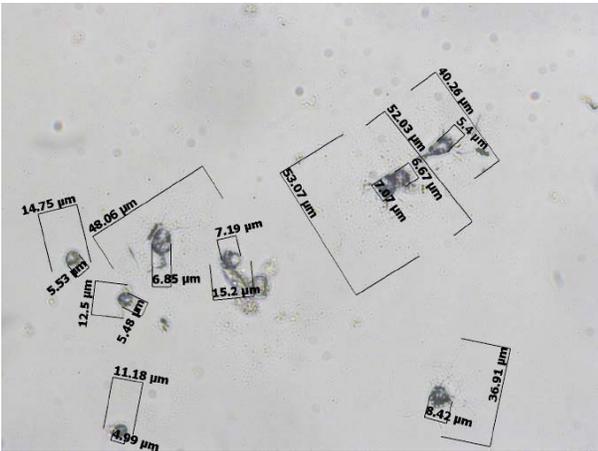
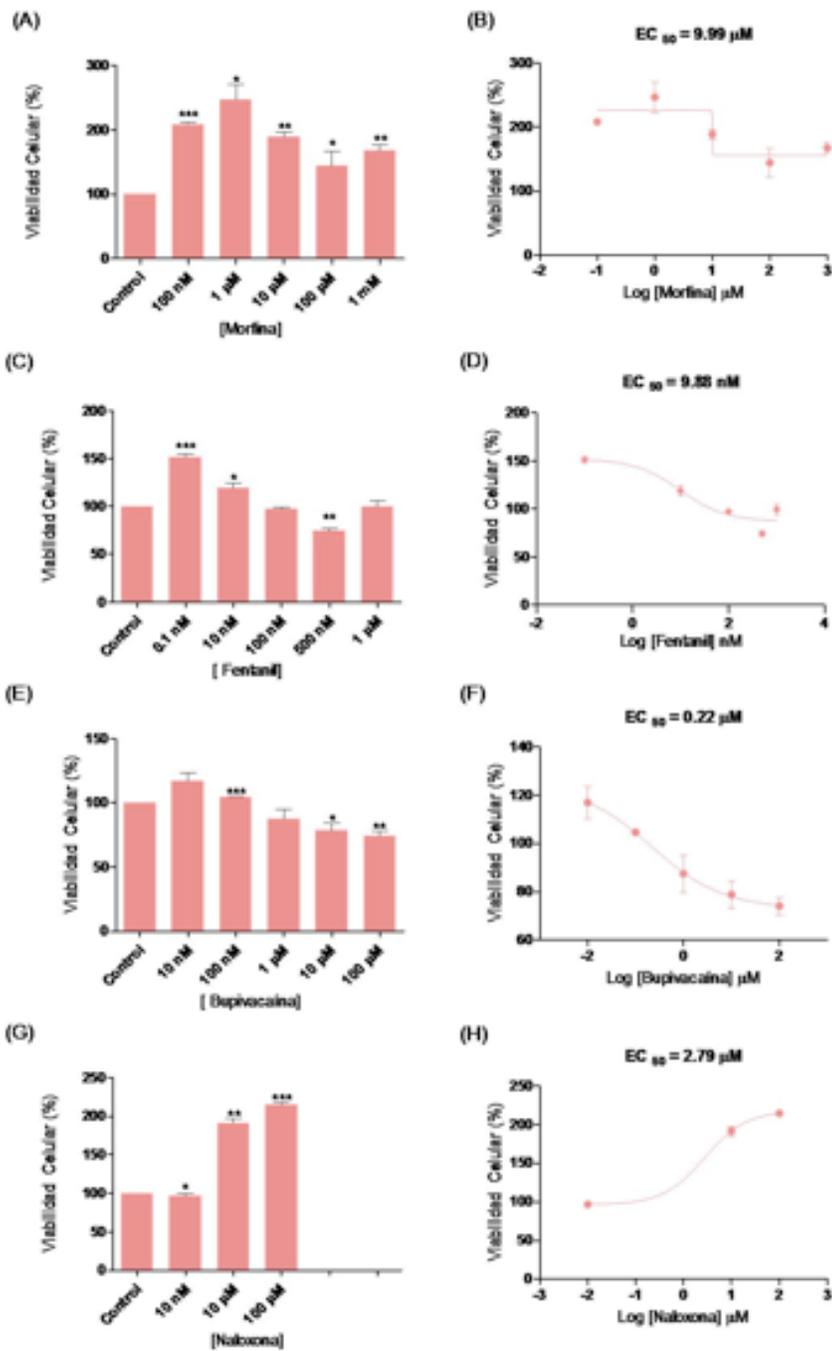


Figura 6.- Medidas de cuerpo y prolongaciones de oligodendrocitos estimulados con bupivacaína 10 uM.



Grafica 4. Los cultivos de oligodendrocitos de 2 días in vitro

fueron estimulados durante 24 horas con diferentes agonistas, la viabilidad celular se determinó post-estimulación con el método del MTT. Cuantificando el número de células teñidas en un microscopio óptico (A, C, E, G). Las gráficas (E, F, G, H) representan la EC_{50} de cada agonista. Representaciones cuantitativas de la viabilidad celular (%) de los oligodendrocitos con respecto al control (100%), oligodendrocitos sin estimulación toxicológica. Los valores de cada barra representan la media \pm SEM de 5 experimentos realizados por triplicado (n=3) bajo las mismas condiciones. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con una prueba de T – Student.

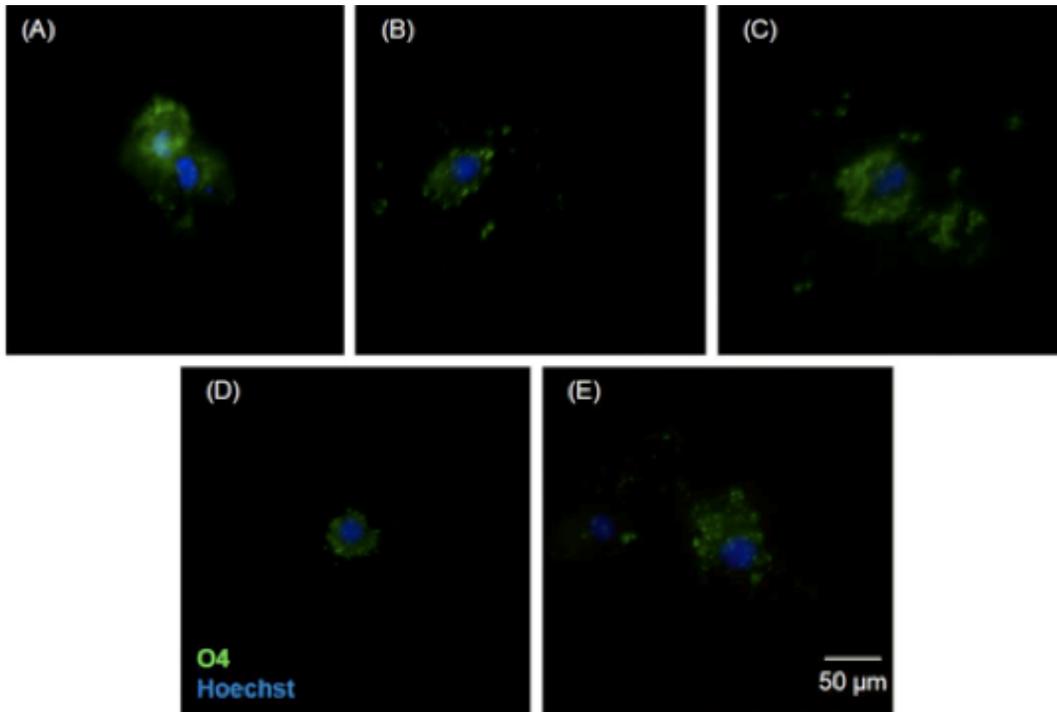


Figura 7.- oligodendrocitos teñidos para la presencia de O4 (molécula específica de éstas células). Oligodendrocitos de 2 días de in vitro estimulados durante 24 h con agonistas de los receptores opioides. Posteriormente fueron marcados con un Ab anti- O4 unido a una molécula conjugada con fluorocromo (verde). El núcleo fue marcado con Hoechst 33258 (azul). (A) Control. (B) Morfina (1 mM). (C) Fentanyl (1 μM). (D) Bupivacaína (10 nM). (E) Naloxona (100 μM). Barra de calibración 30 μm.

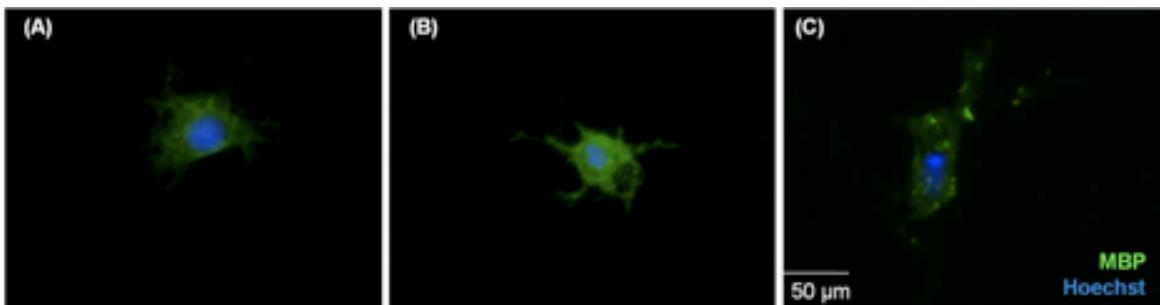


Figura 8.- Oligodendrocitos de 2 días in vitro estimulados durante 24 h con agonistas de los receptores opioides. Las células fueron marcadas con el anticuerpo monoclonal anti-MBP (verde). El núcleo fue marcado con Hoechst 33258 (azul). (A) Control Negativo. (B) Morfina (1 mM). (C) Fentanyl (1 μM). Barra de calibración 50 μm.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albertson DN, Pruetz B, Schmidt CJ, Kuhn DM, Kapatos G, Bannon MJ (2004). Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin. *J Neurochem.* 88(5):1211-9.
2. Andrea M. Trescot, MD, Sukdeb Datta, MD, Opioid Pharmacology, Pain Physician 2008: Opioid Special Issue: 11: S133-S153.
3. AMPA and kainate receptors, *J. Neurosci.* 23:9519–9528.
4. Armstrong SC, Winn GH, Sandson NB (2009). Pharmacokinetic drug interactions of synthetic opiate analgesics. *Psychosomatics*; 50: 169-176.
5. Atanassoff P.G. and Bande M. Castro (2000). Anestesia subaracnoidea: 100 años de una técnica establecida, *Rev. Esp. Anesthesiol. Reanim.* 47: 198-206.
6. Auroy, Yves; Narchi, Patrick; Messiah, Antoine; Litt, Lawrence; Rouvier, Bernard; Samii, Kamran (1997). Serious Complications Related to Regional Anesthesia: Results of a Prospective Survey in France, *Anesthesiology* 87(3):479-486.
7. Bao-Gang Liu BG, Xin-Liang Zhuang, Shi-Tong Li, Guo-Hui Xu, Sorin J. Brull, Jun-Ming Zhang (2001). Effects of Bupivacaine and Ropivacaine on High-voltage-activated Calcium Currents of the Dorsal Horn Neurons in Newborn Rat. *Anesthesiology* 2001; 95:139–43.
8. Babst Charles R, Gilling Bert N, Bupivacaine: A Review, *Anesthesia Progress.* 1978; 25(3): 87–91.
9. Bacher A, Zarnow MH (1997). Lamotrigine inhibits extracellular glutamate accumulation during transient global cerebral ischemia in rabbits. *Anesthesiology*; 86: 459-463.

10. Beardsley D, Holman S, Grantt R, Robinson R, Lindsey J, Bazaral M, Stevens RA. Transient neurologic deficit after spinal anesthesia: Local anesthetic maldistribution with pencil point needles?. *Anesth Analg* 1995; 81: 314-320.
11. Besocke AG, Santamarina R., Romano LM, Femminini RA. Meningitis aséptica inducida por bupivacaína. *Neurología* 2007;22(8):551-552.
12. Bodnar RJ (2007). Endogenous Opiates and Behavior. *Peptides*. 28(12):2435-2513.
13. Brodsky JD (1986), spinal narcotics. *The western Journal of Medicine*; 144(5):602-603.
14. Brull R; McCartney CJL; Chan VWS; El-Beheiry H (2007). Neurological Complication After Regional Anesthesia: Contemporary Estimates of Risk. *Anesth Analg* 2007;104:965-975.
15. Busto R, Dietrich WD, Globus MY. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 1989;20:904-910.
16. Calatayud J and González A (2003). History of the Development and Evolution of Local Anesthesia Since the Coca Leaf. *Anesthesiology* 2003; 98:1503–8.
17. Campos-Esparza MR, Sánchez-Gómez MV and Matute C. (2009). Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. *Cell Calcium*. 45 (4):358-68.
18. Costarino, Andrew T and Downes John J (2005). Pediatric Anesthesia Historical Perspective. *Anesthesiology Clin N Am* 23 (2005) 573– 595.
19. Di Cianni S, Rossi M, Casati A, Cocco C, Fanelli G (2008). Spinal anesthesia: an evergreen technique. *ACTA BIOMED* 2008; 79: 9-17.
20. Eledjam JJ, Viel E, Bruelle P and de la Coussaye JE. Capítulo: Farmacología de los anestésicos locales 36-320-A-10, pp 1-18 en: *Enciclopedia Médico-Quirúrgica*, Editorial Elsevier, Paris (2007).

21. Farah CA and Leclerc N (2008). HMWMAP2: New perspectives on a pathway to dendritic identity. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. Volume 65 Issue 7, Pages 515 - 527.
22. Feinberg AP, Creese I, Snyder SH (1976). The opiate receptor: A model explaining structure-activity relationships of opiate agonists and antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 73, No. 11, pp. 4215-4219.
23. Fitzner D, Schneider A, Kippert A, Wiebke Mo" bius, Willig KI, Hell SW, Bunt G, Gaus K and Simons M (2006). Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *The EMBO Journal* 25, 5037–5048.
24. Florez-Beledo J. Fármacos analgésicos opioides, *Medicine* 1998; 7(105): 4908-4919.
25. Gallagher R (2007). Opioid-induced neurotoxicity. *Canadian Family Physician. Le Médecin de famille canadien* Vol 53:426-427.
26. Hampl KF, Schneider MC, Markus C, Kenneth H. Toxicity of spinal local anaesthetics. *Current opinion in Anaesthesiology*. 1999; 12: 559-564.
27. Hauser KF, Hahn YK, Adjan VV, Zou S, Buch SK, Nath A, Bruce-Keller AJ, Knapp PE (2009). HIV-1 Tat and morphine have interactive effects on oligodendrocyte survival and morphology. *Glia*. 15;57(2):194-206.
28. Hemby SE (2004). Morphine-induced alterations in gene expression of calbindin immunopositive neurons in nucleus accumbens shell and core. *Neuroscience*. 2004;126(3):689-703.
29. Hodgson PS, Neal JM, Pollock JE, Liu SS. The neurotoxicity of drugs given intrathecally (spinal). *Anesth Analg* 1999; 88: 797-809.
30. Horlocker TT, McGregor DG, Matsushige DK , Schroeder DR, Besse JA. (1997). A Retrospective Review of 4767 Consecutive Spinal Anesthetics: Central Nervous System Complications. *Anesth Analg*;84:578-84.

31. Ibarretxe, G. Sánchez, G.M. Campos, E.M. Alberdi, E. and Matute, C. (2006). Differential Oxidative Stress in Oligodendrocytes and Neurons After Excitotoxic Insults and Protection by Natural Poliphenols. *GLIA*. 53:201–211.
32. Ida H, Watanabe Y, Dohi S, Ishiyama T. Direct effects of ropivacaine and bupivacaine on spinal pial vessels in canine: Assessment with closed spinal window technique. *Anesthesiology* 1997; 87: 75-81.
33. Jacobson L (1980), Site of action of intrathecal morphine, *British Medical Journal* Volume 281:1567-1568.
34. Kakinohana M, Nakamura S, Fuchigami T, Davison KJ, Marsala M and Sugahara K (2006). Mu and delta, but not kappa, opioid agonists induce spastic paraparesis after a short period of spinal cord ischaemia in rats; *British Journal of Anaesthesia* 96 (1): 88–94.
35. [Knapp PE](#), [Adjan VV](#), [Hauser KF](#) (2009). Cell-specific loss of kappa-opioid receptors in oligodendrocytes of the dysmyelinating jimpy mouse. [Neurosci Lett](#). 20;451(2):114-8.
36. Krisko Ryan M, Schieferecke Mark A, Williams Todd D, and Lunte Craig E. (2003). Determination of bupivacaine and metabolites in rat urine using capillary electrophoresis with mass spectrometric detection. *Electrophoresis*. 2003 July; 24(14): 2340–2347.
37. Kurt F. [Hauser KF](#), [Hahn YK](#), [Adjan VV](#), [Zou S](#), [Buch SK](#), [Nath A](#), [Bruce-Keller AJ](#), - [Knapp PE](#) (2009). HIV-1 Tat and morphine have interactive effects on oligodendrocyte survival and morphology. [Glia](#). 15;57(2):194-206.
38. Liu BG, Xin-Liang Zhuang, Shi-Tong Li, Guo-Hui Xu, Sorin J. Brull, Jun-Ming Zhang (2001). Effects of Bupivacaine and Ropivacaine on High-voltage–activated Calcium Currents of the Dorsal Horn Neurons in Newborn Rat. *Anesthesiology* 2001; 95:139.

39. Marcondes, FK, Bianchi, FJ and Tanno, AP (2002). Determination of estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*. 62(4A). 2002. pp 609-614.
40. Marks DM, Manan J. Shah, Ashwin A. Patkar, Prakash S. Masand, Geun-Young Park and Chi-Un Pae (2009). Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors for Pain Control: Promise and Premise *Current Neuropharmacology*, 2009, 7, 331-336.
41. Marsala M, Sorkin LS, Yaksh TL.(1994) Transient spinal ischemia in rat: characterization of spinal cord blood flow, extracellular amino acid release, and concurrent histopathological damage. *J Cereb Blood Flow Metab*; 14:604-614.
42. Miguel-Hidalgo JJ (2009). The Role of Glial Cells in Drug Abuse. *Curr Drug Abuse Rev*. 2009; 2(1): 76–82.
43. Morgan EG and Maged SM. *Anestesiología Clínica*, Cap. 16 Bloqueo espinal, epidural y caudal. Tercera edición, Manual Moderno, México 2002. Pp 269-373.
44. Noble F and Cox BM (1996). Differential desensitization of μ - and δ -opioid receptors in selected neural pathways following chronic morphine treatment. *British Journal of Pharmacology* (1996) 117, 161-169.
45. Ohta Y, Activity Changes in Rat Raphe Magnus Neurons at Different Concentrations of Fentanyl In Vitro; *Anesth Analg* 1995;80:890-5.
46. [Persson AI](#), [Thorlin T](#), [Bull C](#), [Zarnegar P](#), [Ekman R](#), [Terenius L](#), [Eriksson PS](#) (2003). μ - and δ -opioid receptor antagonists decrease proliferation and increase neurogenesis in cultures of rat adult hippocampal progenitors. [Eur J Neurosci](#). 17(6):1159-72.
47. Pollock J. Toxicity of spinal agents. *Techniques in regional anesthesia and pain management*. 1998; 2: 194-201.
48. Pollock JE, Spencer S, Liu A, Stephenson CA. Dilution of spinal lidocaine does not alter the incidence of transient neurologic symptoms. *Anesthesiology* 1999; 90: 445-450.

49. Porter SS, Albin MS, Watson WA (1985). Spinal cord and cerebral blood flow responses to subarachnoid injection of local anesthetics with and without epinephrine. *Acta Anaesthesiol Scand*; 29: 330-338.
50. Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, Austin E. Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology*. 1985; 63: 364-370.
51. Rutili A, Maggiani M, Bertelloni C, Molinari D (2007). Persistent overdose caused by a very small dose of intrathecal morphine in an elderly patient.
52. Sanchez ES, Bigbee JW, Fobbs W, Robinson SE, Sato-Bigbee C (2008). Opioid addiction and pregnancy: perinatal exposure to buprenorphine affects myelination in the developing brain. [Glia](#). 56(9):1017-27.
53. Sanchez-Gomez MV, Alberdi E, Ibaretxe G, Torre I, Matute C (2003). Caspase-dependent and caspase-independent oligodendrocyte death mediated by AMPA and Kainate receptors. *The Journal of Neuroscience*; 23(29):9519 –9528.
54. Snyder SH (2007). Opiate Receptor Revisited. *Anesthesiology* 2007; 107:659–61
55. Trescot AM, Datta S, Lee M and Hansen H (2008). Opioid Pharmacology. *Pain Physician* 2008: Opioid Special Issue: 11: S133-S153.
56. [Tryoen-Toth P](#), [Gavériaux-Ruff C](#), [Labourdette G](#) (2000). Down-regulation of mu-opioid receptor expression in rat oligodendrocytes during their development in vitro. [J Neurosci Res](#). 1;60(1):10-20.
57. Rutili A, Maggiani M, Bertelloni C, Molinari D (2007). Persistent overdose caused by a very small dose of intrathecal morphine in an elderly patient undergoing vaginal hysterectomy: a case report. *Minerva Anesthesiol*; 73:433-6.
58. Van Ree JM, Guerriets MAFM and Louk JMJ (1999). Opioids, Reward and Addiction: An Encounter of Biology, Psychology, and Medicine. *Pharmacological Reviews*, Vol. 51(2):341-396.

59. Wakamatsu H, Matsumoto M, Nakakimura K, Sakabe T. The effects of moderate hypothermia and intrathecal tetracaine on glutamate concentrations of intrathecal dialysate and neurologic and histopathologic outcome in transient spinal cord ischemia in rabbits. *Anesth Analg* 1999; 88: 56-62.
60. Wong TH, Critchley LA, Lee A, Khaw KS, Ngan Kee WD, Gin T. Fentanyl dosage and timing when inserting the laryngeal mask airway. *Anaesth Intensive Care*. 2010 Jan;38(1):55-64.
61. Yamamoto K, Ishikawa T, Sakabe T, Taguchi T, Kawai S, Marsala M. The hydroxyl radical scavenger Nicaraven inhibits glutamate release after spinal injury in rats. *Neuroreport* 1998; 9:1655-1659.
62. Yamashita A, Matsumoto M, Matsumoto S, Itoh M, Kawai K, Sakabe T. A comparison of the neurotoxic effects on the spinal cord of tetracaine, lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine administered intrathecally in rabbits. *Anesth Analg* 2003; 97: 512-519.
63. Yanagidate F and Strichartz GR (2006). Bupivacaine Inhibits Activation of Neuronal Spinal Extracellular Receptor-activated Kinase through Selective.
64. [Zagon IS](#), [Rahn KA](#), [Turel AP](#), [McLaughlin PJ](#) (2009). Endogenous opioids regulate expression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a new paradigm for the treatment of multiple sclerosis. [Exp Biol Med \(Maywood\)](#). 234(11):1383-92.