



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA**

**“MANUEL VELÁSICO SUÁREZ”**

**“EFECTO DE LA BUPIVACAÍNA SOBRE LA REGENERACIÓN NEURONAL EN  
RATAS CON PARÁLISIS DEL SEXTO NERVIO CRANEAL INDUCIDO  
QUIRÚRGICAMENTE”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER LA SUB-ESPECIALIDAD DE:**

**OFTALMOLOGÍA NEUROLÓGICA**

**PRESENTA EL:**

**DR. MANUEL ROGELIO AGUILAR HEREDIA**

**TUTOR:**

**DR. MANUEL ENRIQUE ESCANIO CORTÉS**



**MÉXICO D.F.**

**ENERO 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**Este trabajo fue realizado en los Departamentos de Neuro-Oftalmología y Patología, y en el Laboratorio de Neuro-Inmuno-Endocrinología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, de noviembre del 2011 a diciembre de 2012, bajo la asesoría del Dr. Manuel Enrique Escanio Cortés.**

## **AUTORIZACIONES**

---

**DR. NICASIO ARRIADA MENDICOA  
DIRECTOR DE ENSEÑANZA  
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA  
Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

---

**DR. DAVID LOZANO ELIZONDO  
TITULAR DEL CURSO DE NEURO-OFTALMOLOGÍA  
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA  
Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

---

**DRA. IRENE GONZÁLEZ OLHOVICH  
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE NEURO-OFTALMOLOGÍA  
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA  
Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

---

**DR. MANUEL ENRIQUE ESCANIO CORTÉS  
MÉDICO ADSCRITO DE LA DIVISIÓN DE NEURO-OFTALMOLOGÍA  
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA  
Y NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

## **AGRADECIMIENTOS**

### ***A Dios***

Por mi vida y permitirme alcanzar un objetivo más en mi carrera profesional...mi subespecialidad.

### ***A mi esposa***

Por tu apoyo y amor incondicionales, que me permiten lograr mis metas, por escucharme, por tus consejos, por estar cuando más te he necesitado y por haber llegado a mi vida. Te amo mi amor.

### ***A mis padres***

Por su valioso apoyo, sin el cual no hubiera sido posible mi formación académica.

### ***A mis hijos***

Por ser el motor de mi vida.

### ***Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez***

Por darme la oportunidad de continuar mi formación académica y hacerme sentir que día a día puedo ser el mejor.

### ***Al Departamento de Neuro-Oftalmología***

Donde adquirí los conocimientos y experiencia que me permitirán ser un excelente profesional para mejorar la salud visual de mis pacientes.

### ***A mis maestros***

*El Dr. David Lozano*, fundador y decano de la Neuro-oftalmología en México, quien siempre compartió conmigo su experiencia; *la Dra. Irene González*, por su apoyo y comprensión durante estos dos años de formación; y *el Dr. Enrique Escanio*, por compartir conmigo sus ideas y visión, por ser mi tutor y brindarme su apoyo incondicional durante la realización del trabajo que me permitió integrar esta tesis.

### ***A mi amigo, el Dr. Esaú Martínez***

Por tu compañía durante estos dos años de formación, tus consejos; y por hacerme partícipe de la originalidad y alegría que te caracterizan.

### ***A los miembros de los Comités de Ética e Investigación***

Que autorizaron la realización de mi tesis para la obtención de nuevos conocimientos, que con su trabajo impulsan nuevos estudios que permitan mejorar la calidad visual de la sociedad mexicana y el mundo.

### ***A mis colaboradores***

Los Dres. Mauricio Martínez Moreno, Juan Luis Gómez Amador, Ma. Lucinda Aguirre Cruz, Dora Luz de la Cruz Aguilera, Daniel Rembao Bojórquez y a la Química Noemí Gelista Herrera, quienes hicieron posible la integración de este trabajo.

### ***A las ratas de laboratorio***

Por haber sacrificado sus vidas en nombre de la ciencia.

### ***A mis pacientes***

Por haberme motivado a aprender y poner el órgano de los sentidos más importante que tenemos, la vista, en mis manos, por darme la alegría de ver su rostro cuando se encontraban recuperados.

### ***Al medio ambiente***

Por darme el papel y la energía para la impresión de mi trabajo final.

### ***A mí mismo***

Por haber tenido la convicción, decisión, madurez e inteligencia que me permitieron esforzarme para convertir mis sueños en una fantástica realidad.

## ÍNDICE

Glosario.....	8
Relación de figuras y tablas .....	9
Resumen.....	10
1. Introducción.....	11
2. Antecedentes .....	12
3. Hipótesis.....	15
4. Objetivo .....	16
5. Metodología.....	16
5.1. Tipo de estudio	
5.2. Animales	
5.3. Procedimientos	
5.3.1. Técnica quirúrgica de inducción de parálisis por sección selectiva del sexto nervio craneal en rata.	
5.3.2. Aleatorización y formación de grupos experimentales	
5.3.3. Tratamiento	
5.3.4. Técnica de perfusión de animales.	
5.3.5. Preparación de los tejidos para análisis histológico e inmunohistoquímico.	
6. Resultados .....	25
7. Discusión.....	26

8. Conclusiones.....	27
9. Perspectivas.....	27
10.Referencias .....	28
11. Anexo 1. Carta de aprobación del protocolo .....	31



## GLOSARIO

**cm**, centímetro

**gr**, gramo

**H-E**, Hematoxilina y eosina

**Kg**, kilogramo

**mg**, miligramo

**ml**, mililitro

**mm**, milímetro

**NaOH**, Hidróxido de sodio

**No**, número

**PFA**, Paraformaldehído

**PBS**, Solución amortiguadora de fosfatos

**seg**, segundo

## RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS.

**Tabla 1,** Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos.

**Tabla 2,** Parámetros de bomba Peristáltica Perimatic GP.

**Figura 1,** Líneas de orientación para inoculación intraperitoneal.

**Figura 2,** Técnica de perfusión.

## RESUMEN

Los anestésicos locales como lo demuestran diversos estudios, inducen un ciclo de miotoxicidad, degeneración, regeneración e hipertrofia de las fibras musculares estriadas, gracias a la presencia de células mioblásticas satélites; sin efectos adversos en otros tejidos.

En oftalmología, la bupivacaína es usada para realizar bloqueos retrobulbares en cirugías de segmento anterior y en pacientes con estrabismo. En estos últimos, dos de los tratamientos que pueden ser usados son la toxina botulínica, que administrada en el músculo contralateral (no paralizado) genera tracción en el músculo paralizado o la bupivacaína, que se aplica en el músculo paralizado con la finalidad de inducir regeneración muscular.

Muchos estudios clínicos en oftalmología, se han hecho en pacientes con estrabismo secundario a causas metabólicas; sin embargo, se sabe que estas patologías cursarán con un estrabismo paralítico autolimitado, que se resolverá en algunos meses.

En base a lo anterior, el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de la bupivacaína sobre la regeneración neuronal, ya que únicamente se sabe que es un regenerador de fibras musculares.

## 1. INTRODUCCIÓN

El estrabismo es el resultado de un desequilibrio en la fuerza de los músculos extraoculares que mantienen el globo ocular en la posición ortotrópica. Se presenta aproximadamente en el 2% de la población mundial, y en nuestro país en un 4%<sup>1</sup>. Las causas más frecuentes de parálisis o paresias que tienen como consecuencia un estrabismo son las metabólicas, como la diabetes mellitus y la hipertensión arterial sistémica. Causas de menor frecuencia son traumatismos (fracturas orbitarias, lesiones craneales), cirugías, cuadros inflamatorios (celulitis orbitaria, meningitis tuberculosa, miositis orbitaria), tumores (meningioma, neurinoma acústico, tumores orbitarios o metástasis), enfermedades inmunológicas (esclerosis múltiple, arteritis de células gigantes, enfermedad de Graves, miastenia gravis) y aneurismas, entre otras.

Los síntomas del estrabismo son hiperemia, dolor ocular, ojo seco, ardor, cefalea y diplopía, la cual puede variar dependiendo de los músculos afectados, ocasionando un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes. El tratamiento actual de las parálisis oculomotoras se lleva a cabo con la administración de vitamina B, agentes anestésicos, toxina botulínica y en algunos casos, cirugía de uno o más músculos extraoculares<sup>2</sup>.

Los anestésicos locales son fármacos que bloquean de forma transitoria la conducción nerviosa, originando una pérdida de las funciones autónoma, sensitiva y/o motora de una región del cuerpo. La bupivacaína es un anestésico local

bloqueador de canales de sodio tipo amida con metabolismo hepático. Su vida media es de aproximadamente 6 horas, teniendo como principal efecto adverso la cardiotoxicidad tras su administración endovenosa<sup>3</sup>.

## **2. ANTECEDENTES**

Bruce Carlson, comenzó los estudios sobre el efecto de la aplicación de anestésicos locales en los músculos extraoculares paralizados con la finalidad de provocar hipertrofia muscular. Recientemente se ha introducido la administración de toxina botulínica A en el músculo antagonista para provocar debilitamiento y promover el reposicionamiento del músculo paralizado. Sin embargo, se ha limitado su uso debido a la corta duración de su efecto y a los efectos colaterales que produce a nivel sistémico y sobre los músculos extraoculares adyacentes (e.g.ptosis).

Las inyecciones intramusculares de anestésicos locales generalmente resultan en daño de la musculatura estriada y mionecrosis. La tetracaína y procaína provocan un daño menor, mientras que con la bupivacaína se ha reportado un daño más severo<sup>5</sup>.

En 1970, Beniot y Belt reconocieron que el bloqueo del canal de sodio por medio del uso de la bupivacaína causaba muerte de las células musculares, una

pérdida temporal de la función y la regeneración subsecuente del músculo esquelético<sup>6</sup>.

Se ha descrito que los anestésicos locales, producen degeneración y posteriormente regeneración e hipertrofia muscular, observando que la pérdida de fibras musculares ocurre tan pronto como 15 minutos posteriores a la administración del anestésico. Histológicamente, a los pocos minutos de su administración, las miofibrillas se contraen, hay degeneración lítica del retículo sarcoplásmico de la musculatura estriada y edema de los miocitos. Pasadas algunas horas, se produce mionecrosis sin que haya afección de mioblastos, lámina basal y tejido conectivo. Dos a cuatro semanas después, hay regeneración tisular e hipertrofia muscular<sup>7-11</sup>; pudiendo ello ocurrir hasta 4 meses posteriores<sup>6</sup>.

La regeneración muscular reportada, se acompaña de la presencia de N-CAM, una molécula de adhesión celular neuronal que se presenta en células mioblásticas<sup>12</sup>.

En el 2003, Calgüner y colaboradores compararon la bupivacaína y la lidocaína, administrándolas alrededor del nervio facial de conejos blancos para producir parálisis facial. Se contó con tres grupos: grupo bupivacaína, grupo lidocaína y grupo solución salina (control). Se observó que ambos anestésicos produjeron atrofia de los músculos de la mímica 2 semanas posteriores y 6 semanas después pérdida de miofibrillas y regeneración muscular. Concluyeron

que la lidocaína causó más cambios atróficos y menor regeneración muscular que la bupivacaína<sup>13</sup>.

En un estudio realizado por Choul y colaboradores en el 2004, se compararon los cambios histológicos presentados en los músculos extraoculares de conejos blancos tras la inyección de bupivacaína y ricina mAb 35. Se inyectaron los músculos rectos superior e inferior con bupivacaína a dosis de 0.4mg/0.3ml y ricina mAb 35 a dosis de 0.2mcg/kg/0.3ml. En los resultados se encontró inflamación y destrucción de las miofibrillas en el sitio de aplicación de la bupivacaína, mientras que donde se aplicó la ricina el daño fue difuso. La regeneración de las miofibrillas con un núcleo central se encontró a la semana posterior de la aplicación y la inflamación se redujo a las 2 semanas<sup>14</sup>.

En el 2006, Politi y colaboradores realizaron un estudio donde demostraron la regeneración del músculo soleo, inducida por bupivacaína en ratas Wistar, mediante análisis ultraestructural e inmunohistoquímico. Se administró 1ml de bupivacaína al 0.5% a 21 ratas, examinándose por biopsia a los 1, 2, 3, 5, 7, 14 y 21 días (3 ratas para cada grupo, no teniendo grupo control). Día 1, observaron la presencia de células inflamatorias mononucleares invadiendo el sarcoplasma de las fibras necróticas; día 2, sólo existieron cambios degenerativos; día 3, presencia de células mioblásticas; día 5, formación de los miotubos con múltiples núcleos centrales y nucléolos eucromáticos y en los días 14 y 21, existió regeneración de fibras musculares. Inmunohistoquímicamente, observaron mayor concentración de

desmina que de vimentina, sustancias responsables de la miogénesis y la regeneración de las fibras musculares<sup>15</sup>.

Onizuka y colaboradores, realizaron el primer y único estudio sobre la regeneración neuronal y formación de sinapsis mediante el uso de anestésicos locales e inhalados; utilizaron poblaciones neuronales de caracol de agua fresca *Lymnaea stagnalis* in vitro para tratar de determinar y comparar cómo las concentraciones de sevoflurano e isoflurano inhalado y el uso de los anestésicos locales, lidocaína y bupivacaína afectaban la transmisión sináptica; y si éstas acciones implicaban mecanismos presinápticos y/o postsinápticos. Concluyeron que la exposición a anestésicos locales no producen regeneración neuronal, sin embargo, el uso de anestésicos inhalados, sí indujo un mayor número de dendritas<sup>16</sup>.

### **3. HIPÓTESIS**

Si la bupivacaína muestra regeneración de las fibras musculares posteriores a la denervación, es probable que también produzca regeneración neuronal en las miofibrillas regeneradas.



## **4. OBJETIVOS**

### **Objetivo principal**

Evaluar si el uso de la bupivacaína causa regeneración neuronal en el músculo recto lateral denervado quirúrgicamente en ratas Wistar.

### **Objetivo secundario**

Valorar los cambios histopatológicos del músculo recto lateral denervado quirúrgicamente en ratas Wistar.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Tipo de estudio**

Estudio experimental.

### **5.2. Animales**

En este trabajo fueron usadas 40 ratas Wistar macho, con una edad entre 3-6 meses y con un peso de 220 - 250 gr., bajo los lineamientos éticos requeridos para el uso de animales de experimentación.

### **5.3. Procedimientos**

**5.3.1 Técnica quirúrgica de inducción de parálisis por sección selectiva del sexto nervio craneal en rata.**

Fijación de la rata al marco de estereotaxia, inducción de anestesia utilizando ketamina a dosis de 40 mg/kg peso y xilacina a dosis de 5-10mg/kg peso intraperitoneal. Al cabo de 10 minutos se realiza antisepsia craneal con Isodine. Bajo visión magnificada con microscopio Opmi (Carl-Zeiss®) a 10x, se realiza incisión con bisturí de hoja No. 15 desde 2 mm. caudal al canto externo del ojo hacia el meato auditivo externo, de unos 5 mm. de longitud involucrando la piel, exponiendo la aponeurosis superficial del músculo temporal, la cual se incide paralela a la proyección de la línea curva temporal superior de la rata. Se profundiza realizando coagulación bipolar del músculo y disección del mismo hasta exponer la pared postero-lateral de la órbita, la cual se morcela cuidadosamente con gubia fina, exponiendo de esta manera el contenido orbitario, se identifica la glándula lagrimal en un saco de tejido conectivo la cual se respeta y rechaza lateralmente utilizando pequeños hisopos hasta exponer el recto lateral del animal el cual se identifica, y sigue hasta el vértice del cono orbitario donde se aprecia el sexto nervio craneal de la rata que discurre en la superficie externa del músculo, paralelo a éste. Es importante no manipular intensamente la región pues se puede presentar descarga vagal que lleve al animal a asistolia. Una vez identificado el nervio se corta con microtijera en el punto más proximal a su salida de la cavidad intracraneal. Se verifica la hemostasia y se repara con vicryl del 5-0 la aponeurosis superficial del temporal y con nylon 5-0 la piel de la rata. Se desmonta del estereotáxico y se deja en el área de recuperación.

### **5.3.3. Aleatorización y formación de grupos experimentales**

En este proyecto se integraron en forma aleatoria ocho grupos de cinco ratas cada uno, divididos en dos bloques con denervación unilateral del sexto nervio craneal derecho:

#### **Bloque 1.**

1. Grupo A: Grupo control (Sham). No se realizó procedimiento alguno. Las ratas fueron sacrificadas a los quince días.
2. Grupo B: Grupo al cual se le realizó denervación unilateral de sexto nervio craneal derecho y no se aplicó tratamiento alguno. Las ratas fueron sacrificadas a los quince días.
3. Grupo C: Grupo al cual se le realizó denervación unilateral de sexto nervio craneal derecho y se aplicó solución fisiológica. Las ratas fueron sacrificadas a los quince días.
4. Grupo D: Grupo al cual se le realizó denervación unilateral de sexto nervio craneal derecho y se aplicó bupivacaína. Las ratas fueron sacrificadas a los quince días.

#### **Bloque 2.**

5. Grupo A: Grupo control (Sham). No se realizó procedimiento alguno. Las ratas fueron sacrificadas en un mes.
6. Grupo B: Grupo al cual se le realizó denervación unilateral de sexto nervio craneal derecho y no se aplicó tratamiento. Las ratas fueron sacrificadas en un mes.

7. Grupo C: Grupo al cual se le realizó denervación unilateral de sexto nervio craneal derecho y se aplicó solución fisiológica. Las ratas fueron sacrificadas en un mes.
8. Grupo D: Grupo al cual se le realizó denervación unilateral de sexto nervio craneal y se aplicó bupivacaína. Las ratas fueron sacrificadas en un mes.

#### **5.3.4. Tratamiento**

Todos los tratamientos fueron administrados a dosis única en volumen de 0.01ml en el músculo recto lateral, posteriores a la denervación. La dosis de bupivacaína encontrada en esta administración corresponde a 0.05 mg. de bupivacaína (Buvacaína®).

#### **5.3.4. Técnica de perfusión de animales**

##### **A) Material**

1. Bomba peristáltica.
2. Jeringa de 3 ml.
3. Gasas.
4. Alcohol al 70%.
5. Ketamina (1000 mg/10ml) y xilacina (20 mg/ml).
6. Solución de lavado: PBS 1x (1000 ml).

## PBS 1x para 1 litro

Tabla 1. Preparación de PBS

Soluto	Cantidad
Cloruro de sodio	6.5
Fosfato de potasio monobásico	2.8
Fosfato de potasio bibásico	0.4

7. Solución de fijado: PFA al 2% (1000 ml).

- Calentar 300 ml. de agua bidestilada a no más de 60°C.
- Pesar 20 gr. de PFA (Se encuentra en refrigeración).
- Vertir los 20 gr. de PFA en el agua bajo agitación.
- Adicionar unas gotas de NaOH 10N/1N hasta la completa disolución del PFA.
- Pesar reactivos para 1L de PBS 1x, disolverlos y aforar a 700ml con agua bidestilada.
- Adicionar el PBS al PFA bajo agitación, después filtrarlo y ponerlo en hielo hasta que se use y durante su utilización.

8. Adicionar a la solución de lavado 1ml por cada 500ml.

## B) Parámetros de bomba peristáltica Perimatic GP (Set up → Options)

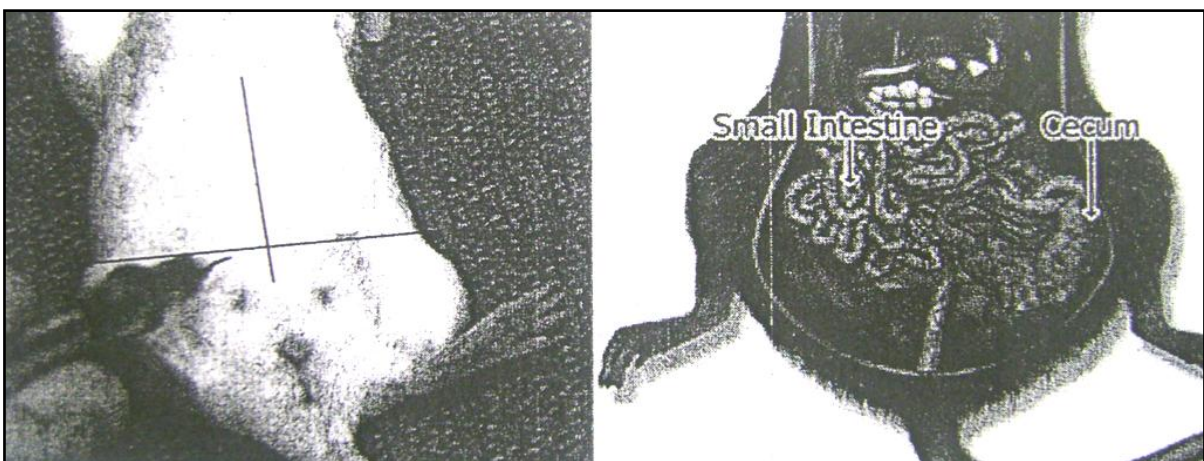
**Tabla 2. Parámetros de bomba Peristáltica Perimatic GP**

<b>Parámetro</b>	<b>Valor</b>
Volumen	0.5 ml.
Count	999
Delay	0.5 seg.
Modo	Automatic
Profile	Show/Slow/Slow
Tube	5 mm.
Dirección	Run clockwise
Round	

## C) Anestesia intraperitoneal

- Cargar jeringa con ketamina 1.5 ml. (1000 mg/10ml) y xilacina 0.2 ml. (20 mg/ml).
- Tomar la rata por el dorso, con una sola mano, en un solo movimiento.

- Con la rata correctamente inmovilizada (evitando cualquier movimiento durante el procedimiento) inclinarla caudalmente y trazar una línea imaginaria que cruce su abdomen transversalmente justo sobre sus rodillas.
- La aguja deberá ser insertada sobre esta línea, en el lado derecho del animal y lo más cercano posible a la línea que divide longitudinalmente el abdomen (Figura 1).
- La aguja debe alcanzar una profundidad de aproximadamente 0.5 cm. y debe insertarse con una inclinación de unos 30° con respecto a la superficie del abdomen.
- Aspirar para asegurarse de que no se ha alcanzado ningún vaso sanguíneo, ciego o vejiga urinaria.
- Si ningún fluido es aspirado, proceder a la inyección de la muestra.
- Retirar la aguja y presionar ligeramente la zona de inyección.

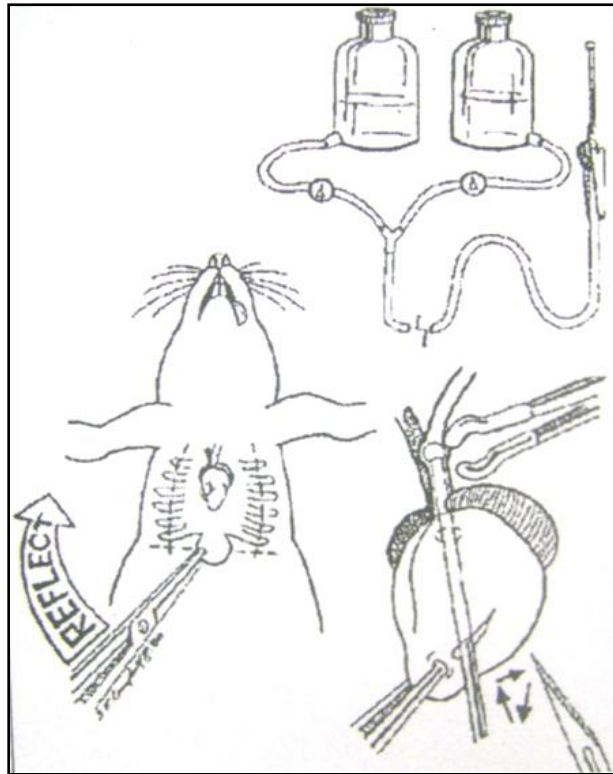


**Fig. 1. Líneas de orientación para inoculación intraperitoneal.**

#### **D) Perfusión in vivo**

- Con la rata ya anestesiada, colocarla en posición decúbito supino sobre una placa/rejilla adecuada para la recogida de los líquidos de lavado y fijación.
- Estirar y sujetar las extremidades.
- Lavar la superficie de la rata con etanol 70°.
- Realizar un corte en la piel a la altura del final del esternón, separar la piel y cortar las costillas en paralelo a los pulmones para exponer el corazón.
- Insertar la aguja, de la jeringuilla o la manguera (en caso de utilizar el aparato de perfusión) que contiene la solución de lavado, en el ventrículo izquierdo y profundizar en dirección a la aorta.
- La aguja puede fijarse con pinza Kelly durante la perfusión.
- Realizar una incisión en la aurícula derecha para permitir el escape de la circulación de retorno de los líquidos de lavado.
- Proceder al lavado con la solución salina o PBS 1x (500 ml.)
- Proceder a la perfusión de la solución de fijado (PFA 2% 500 ml.)
- Una vigorosa contracción muscular es indicativa de la correcta fijación del animal.
- Al finalizar, retirar la aguja y proceder a la extracción de los órganos deseados.





**Fig. 2. Técnica de perfusión.**

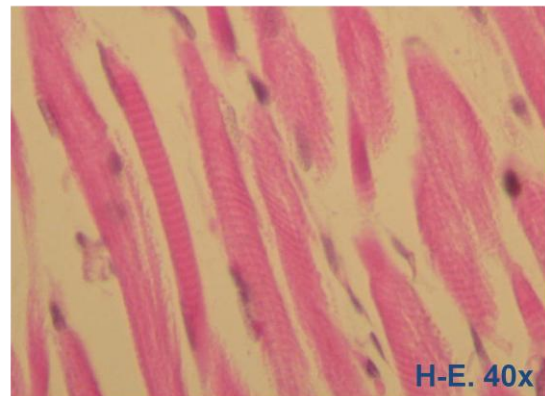
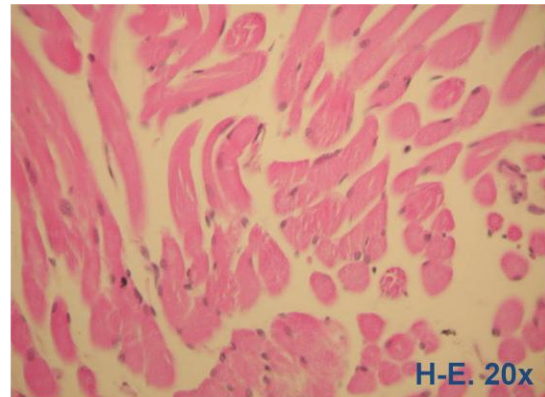
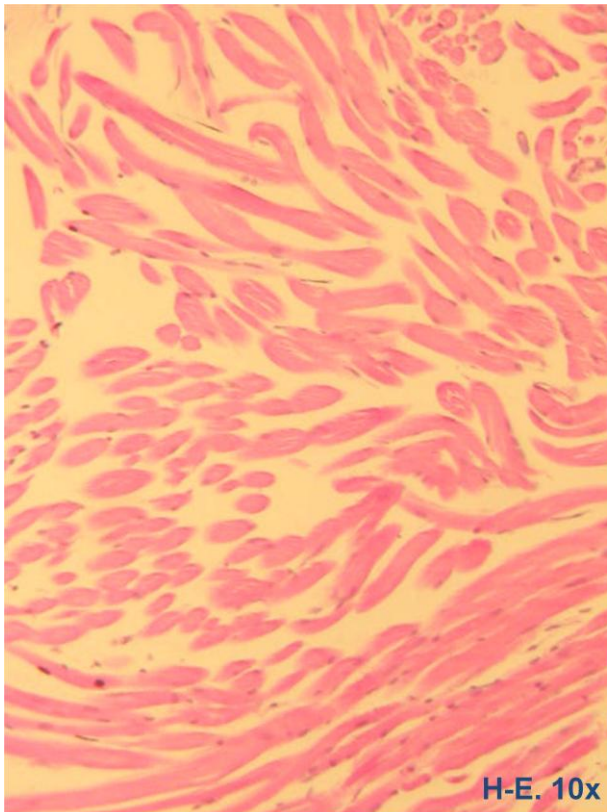
### **5.3.5. Preparación de los tejidos para análisis histológico e inmunohistoquímico**

1. Se tomaron los tejidos de músculo recto lateral del ojo denervado posterior a la realización de la técnica de perfusión.
2. Se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina (H-E) y Kluver-Barrera.
3. Se realizará inmunohistoquímica mediante determinación de anticuerpos específicos contra mielina.

## 6. RESULTADOS

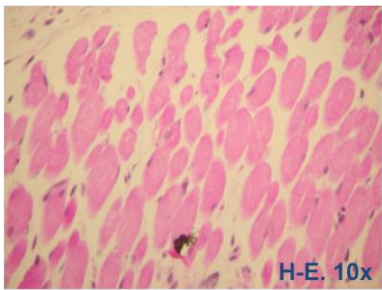
Durante la realización de la microscopía óptica se encontraron los siguientes resultados. La primera técnica empleada fue hematoxilina y eosina (H-E), en el primer grupo de imágenes observamos el grupo A (CHAMP), la imagen del lado izquierdo muestra una vista panorámica del músculo esquelético con disposición de las fibras de manera transversal y longitudinal; mientras que los acercamientos nos permiten observar la estructura normal de las fibras musculares; por último la imagen inferior derecha corresponde a las estrías de las proteínas musculares.

### Grupo "A"

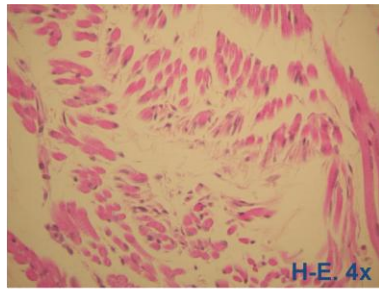


Las siguientes imágenes muestran los cambios observados a nivel histológico, y como se aprecia comparten la atrofia muscular caracterizada por la disminución en el tamaño y la presencia de bordes angulados, propias de la denervación; recordando que corresponden a grupos donde se realizó el procedimiento quirúrgico.

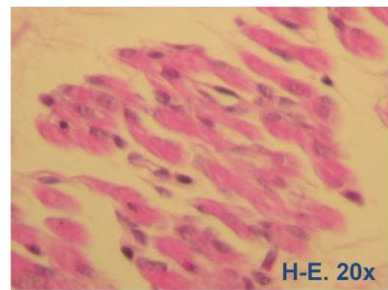
**Grupo "B"**



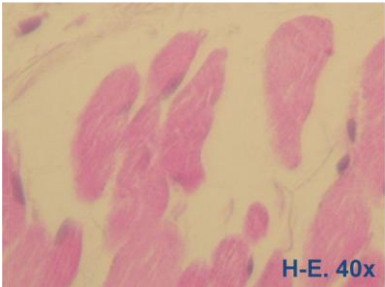
**Grupo "C"**



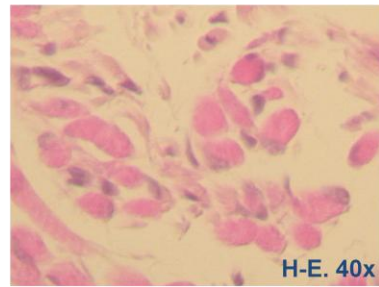
**Grupo "D"**



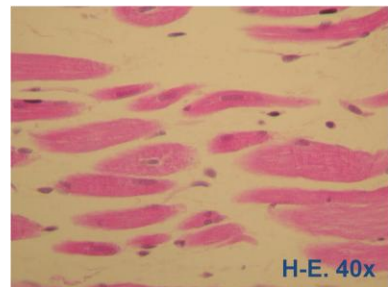
Grupo "B"



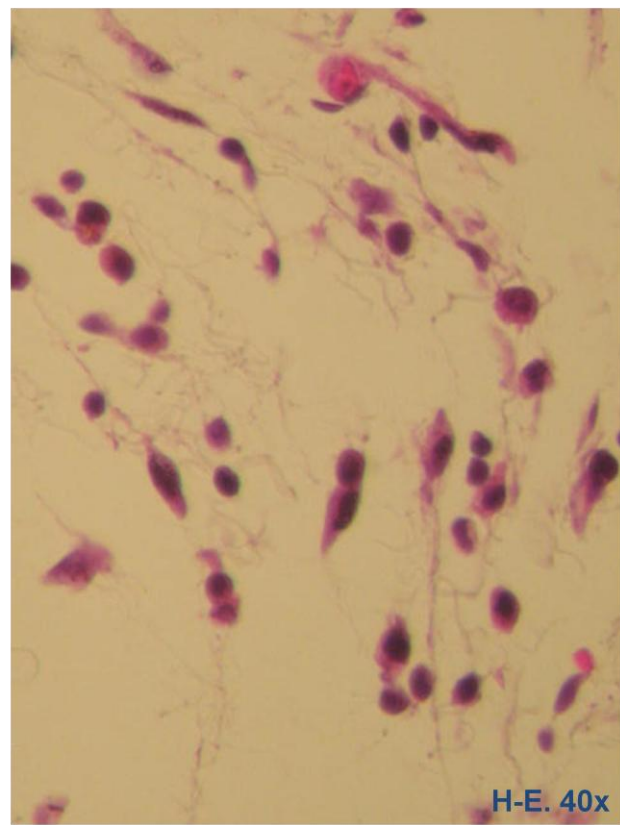
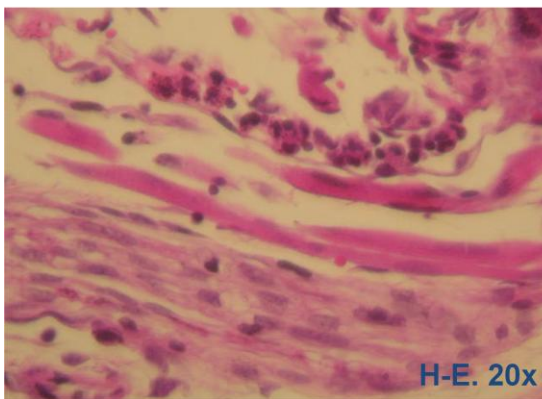
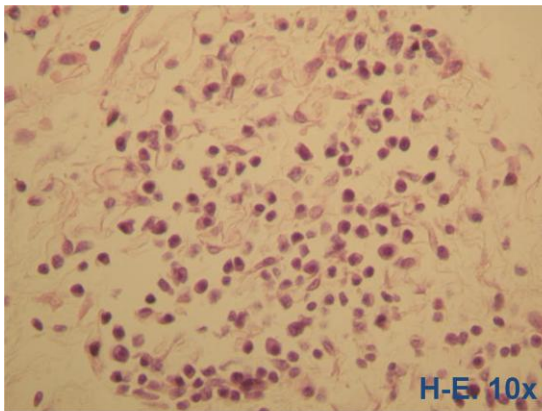
Grupo "C"



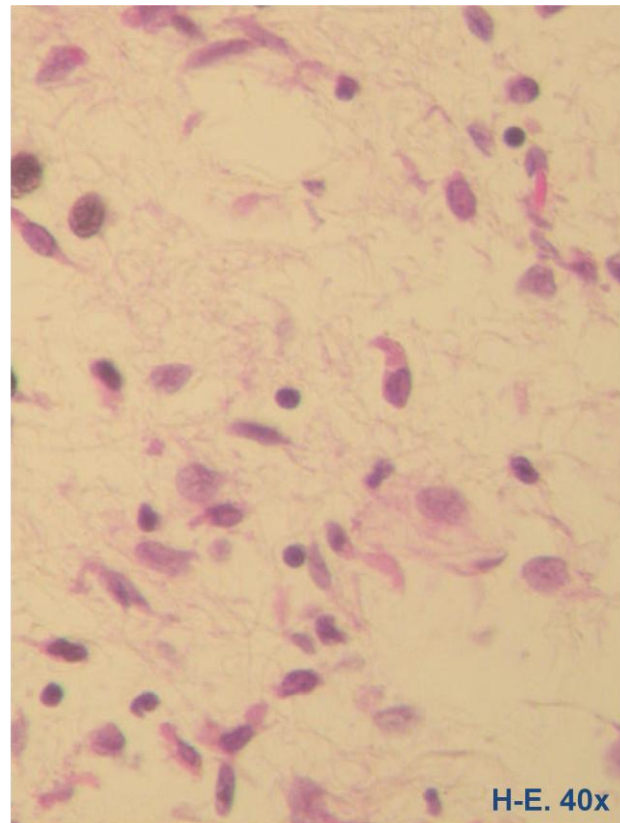
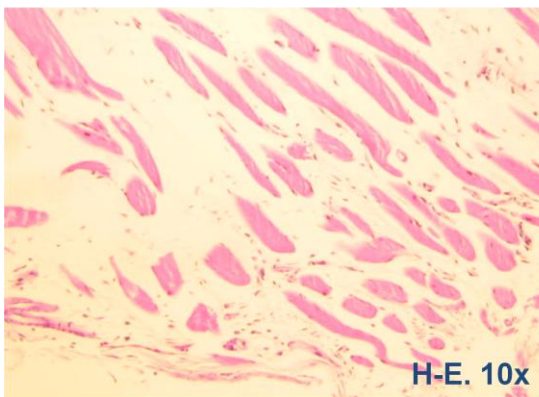
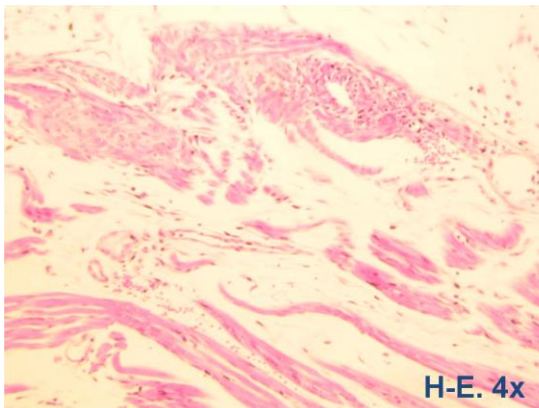
Grupo "D"



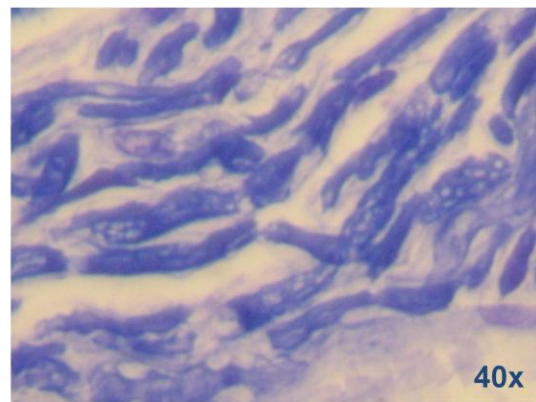
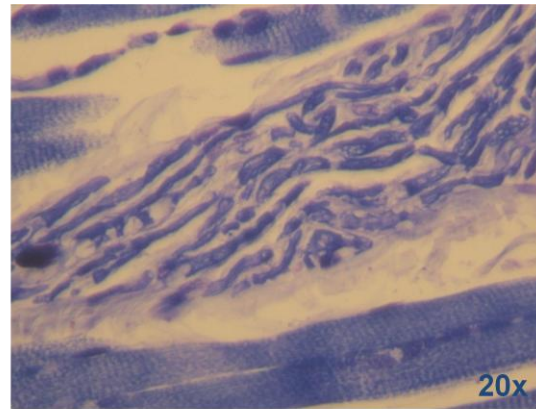
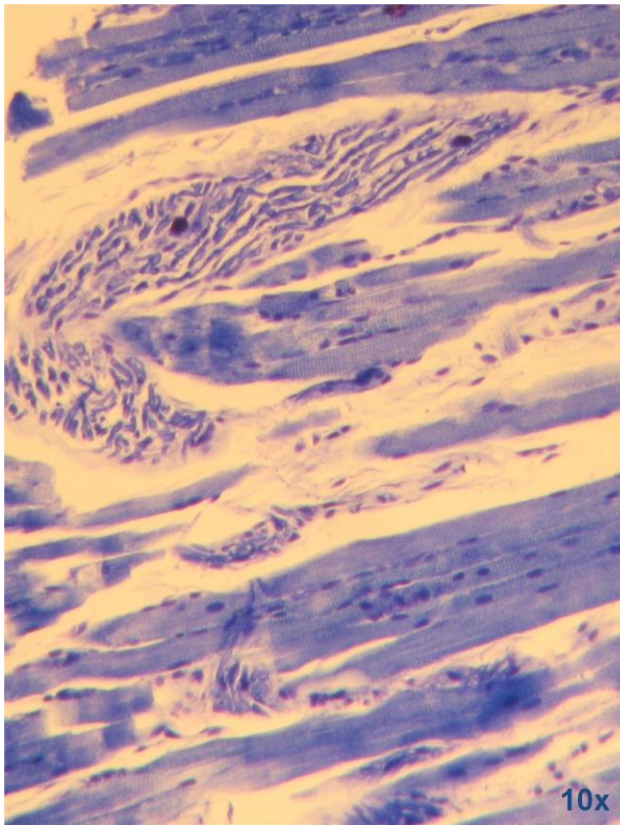
Es importante destacar que únicamente el grupo “D” mostró un proceso inflamatorio de tipo monocítico, con predominio de linfocitos y macrófagos como se muestra en las siguientes imágenes. La superior izquierda corresponde al infiltrado inflamatorio en tejidos blandos adyacentes (grasa y músculo); en la inferior izquierda se observa infiltrado inflamatorio interfascicular y en el acercamiento (derecha), corroboramos las características celulares (linfocitos y macrófagos).



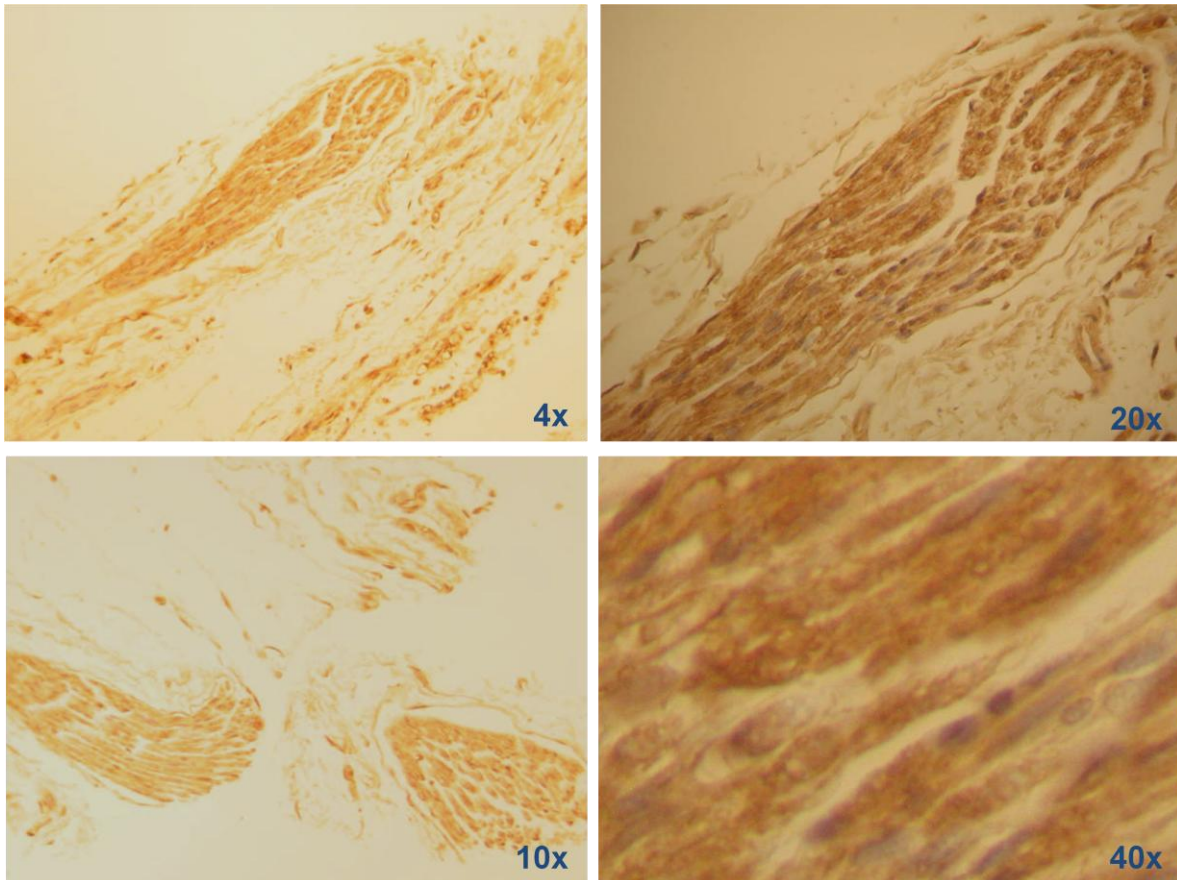
Continuando con lo encontrado para el grupo “D” y como acompañante propio de la inflamación se observó edema interfascicular. En la imagen superior izquierda se observa un vaso con manguillos perivasculares rodeado de infiltrado inflamatorio, en la imagen inferior izquierda vemos la separación de las fibras, además de ser atróficas por el edema intersticial; finalmente en el acercamiento vemos el material propio del edema tipo acuoso con presencia de células inflamatorias.



Para asegurarnos de la precisión de los resultados, se utilizaron técnicas especiales; la histoquímica para mielina (Kluver-Barrera), en la cual podemos identificar los filetes nerviosos con estructura conservada en los diferentes acercamientos y en todos los grupos.



Finalmente se realizó inmuno-histoquímica, técnica basada en una reacción antígeno-anticuerpo; en este caso se utilizó un anticuerpo dirigido específicamente hacia la mielina. A través de esta técnica, pudimos identificar los filetes nerviosos y observar la integridad de los mismos, como lo demuestran los acercamientos.



## 7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con las tinciones de H-E, no corresponden con los ya reportados en la literatura; con ello confirmamos que la bupivacaína per se, no es capaz de inducir regeneración tisular y la consecuente hipertrofia de la musculatura estriada.

Como ya sabemos, la bupivacaína actualmente es usada en cirugía de estrabismo, aplicándose directamente al músculo parético para inducir hipertrofia muscular. Sin embargo, sabemos que el uso actual es en parálisis o paresias de causa metabólica, la cual con o sin tratamiento resolverá en un periodo determinado de tiempo.

Los hallazgos para ambos grupos Sham, fueron fibras musculares sin cambios morfológicos representativos, esto es explicable desde el punto de vista en que no se realizó procedimiento alguno. El resto de los bloques, mostraron atrofia de las fibras musculares tan pronto como 15 días y a 1 mes de la denervación. Con esto podemos afirmar que la bupivacaína no genera hipertrofia muscular ni condiciona regeneración neuronal.

Existen diversos estudios en ratas de laboratorio que demuestran el efecto de la bupivacaína sobre la musculatura estriada (sin daño nervioso), pero ninguno ha evaluado si existe dicho efecto posterior a denervación.



## **8. CONCLUSIONES**

Nuestras descripciones histológicas preliminares no coinciden con los hallazgos descritos en la literatura tras la aplicación de bupivacaína en la musculatura estriada. Este es el primer estudio en el cual simulamos una parálisis oculomotora de causa neurológica al inducir un daño estructural a nivel del propio nervio. Al inducir dicho daño, los grupos B, C y D compartieron la atrofia muscular. El análisis con la tinción de Kluver-Barrera que analiza vainas de mielina, no mostró cambio alguno en el filete nervioso de ninguno de los grupos. Así mismo, los anticuerpos específicos contra mielina, corroboraron la integridad de las fibras nerviosas vistas en la histoquímica. Por ende, los resultados preliminares, demuestran que no existe regeneración neuronal tras la aplicación de la bupivacaína.

## **9. PERSPECTIVAS**

Se pretende reproducir en una segunda etapa este modelo, para ser estudiado por microscopia electrónica, de forma tal que estos resultados presentados sean cuantificables, y de esta forma medir los axones mielínicos, amielínicos y células de Schwann, que darán veracidad a los resultados preliminares aquí descritos.

## 10. REFERENCIAS

1. Von Noorden, G. Binocular Vision and Ocular Motility. Theory and Management of Strabismus. Edición 2002. Pág. 153-157.
2. Romero Apis, David. Estrabismo. Edición 2000. Editorial Auroch. Pág 3.
3. Chen YW, et al. Spinal blockades of class I antiarrhythmic drugs with bupivacaine by isobolographic analysis in rats. *Neurosci Lett.* 2012 Oct 18;528(1):46-50.
4. Scott AB. Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery. *Ophthalmology.*1980; 87: 1044–1049.
5. Wolfgang Zink, et al. The Long Term Myotoxic Effects of Bupivacaine and Ropivacaine After Continuous Peripheral Nerve Blocks. *Anesth Analg* 2005;101:548–54.
6. Beniot PW, Belt WD. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine. *J Anat* 1970; 107:547-556.
7. Schmalbruch, H., and M. Lewis, 1994: A comparison of the morphology of denervated with aneurally regenerated soleus muscle of rat. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 15, 256–266.
8. Sesodia, S., and M. J. Cullen, 1991: The effect of denervation on the morphology of regenerating rat soleus muscles. *Acta Neuropathol.* 82, 21–32.

9. Hall-Craggs EC. Early ultrastructural changes in skeletal muscle exposed to local anaesthetic bupivacaine (marcaine). *Br J Exp Pathol* 1980a; 60:139–49.
10. Bradley WG. Muscle fiber splitting. In: Mauro A, eds. *Muscle regeneration*. New York: Raven Press, 1979:215–32.
11. Rosenblatt JD, Woods RI. Hypertrophy of rat extensor digitorum longus muscle injected with bupivacaine. A sequential histochemical, immunohistochemical, histological and morphometric study. *J Anat* 1992; 181: 11–27.
12. Kirschen McLoon, Linda. Regional Differences in the Subacute Response of Rabbit Orbicularis Oculi to Bupivacaine-Induced Myotoxicity as Quantified With a Neural Cell Adhesion Molecule Immunohistochemical Marker. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, November 1993, Vol. 34, No. 12.
13. Calgüner E., et al. Atrophic and Regenerative Changes in Rabbit Mimic Muscles after Lidocaine and Bupivacaine Application. *Anat. Histol. Embryol.* 2003. 32, 54–59
14. Choul Yong Park. Acute effect of bupivacaine and ricin mAb 35 on extraocular muscle in the rabbit. *Current Eye Research* 2004, Vol. 29, Nos. 4–5, pp. 293–301.
15. Politi P.K, et al. Bupivacaine-induced Regeneration of Rat Soleus Muscle: Ultrastructural and Immunohistochemical. *Ultrastructural Pathology*, 2006. 30:461–469

16. Orizuka, Shin, et al. Long-term Exposure to Local but Not Inhalation Anesthetics Affects Neurite Regeneration and Synapse Formation between Identified Lymnaea Neurons. *Anesthesiology* 2005; 102: 353-63.

## 11. ANEXO 1. Carta de aprobación del protocolo por el Comité de Investigación



INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ



DICIEMBRE 19, 2012

**DR. MANUEL ENRIQUE ESCANIO CORTÉS**  
DEPTO. DE NEURO-OFTALMOLOGÍA  
PRESENTE.

COMUNICO A USTED QUE EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN TITULADO:  
"EFECTO DE LA BUPIVACAINA SOBRE LA REGENERACIÓN NEURONAL EN  
RATAS CON PARALISIS DEL SEXTO NERVIO CRANEAL INDUCIDO  
QUIRURGICAMENTE" No. Reg. 79/12 HA SIDO APROBADO POR EL COMITÉ  
DE INVESTIGACIÓN DE ESTE INSTITUTO, PARA SU REALIZACIÓN.

ATENTAMENTE

**DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ**  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN