



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS
EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA SALUD**

TESIS DOCTORAL

**EFECTO DE ROPIVACAINA Y
LEVOBUPIVACAINA SOBRE CONDROCITOS
HUMANOS IN VITRO. DURANCIÓN DE LA
BUPIVACAINA INTRAARTICULAR IN VIVO**

**PRESENTADA POR:
JESÚS COBO MOLINOS**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. ALBERTO D. DELGADO MARTÍNEZ**

JAÉN, 21 DE FEBRERO DE 2014

ISBN 978-84-8439-844-8

DIRECTOR

Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por D. Alberto Damián Delgado Martínez, Doctor en Medicina y Cirugía, Medico especialista en Cirugía Ortopédica y Traumatología, Profesor asociado al Departamento de Cirugía de la Universidad de Jaén y Director de la Unidad de Gestión Clínica de Cirugía y Traumatología del Hospital “Reina Sofía” de Córdoba

FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido realizado a través de la financiación de proyectos de investigación, ayudas al grupo recibidas del Plan Andaluz de Investigación y del Plan Propio de la Universidad de Jaén al grupo CTS-380

El doctorando ha disfrutado de una beca de investigación F.P.D.I. *Formación de Personal Docente e Investigador predoctoral en áreas de conocimiento consideradas deficitarias por necesidades docentes* (convocatoria de 10 de febrero de 2009 –BOJA nº 47 de 10 de marzo)

AGRADECIMIENTOS

A Alberto Delgado, director de esta tesis doctoral, gran amigo y compañero, gracias por haberme ayudado en todo este largo camino.

A mis padres Diego y Carmen, por haberme inculcado desde pequeño a esforzarme en mi trabajo, ser constante y conseguir mis metas.

A mi hermano Antonio, que tanto me ha ayudado y animado en la investigación clínica y sé que también se siente orgulloso de este trabajo.

A mi esposa Isabel M^a, siempre presente en mi vida y a quien he robado tiempo y paciencia durante largos ratos para realizar esta tesis.

A mis compañeros del hospital Neurotraumatológico de Jaén Manuel Molina y Mercedes Poncela, cuya ayuda ha resultado ser indispensable para llevar a cabo este trabajo.

A mis compañeros de la Facultad de Medicina de Granada, en especial a Juan Antonio Marchal, Elena López y Alberto Ramírez, por el largo tiempo pasado en laboratorio, gracias a vuestros ánimos y ayuda.

A mis compañeros del departamento Orthopedic Research del Hospital Brigham and Women's perteneciente a la Facultad de Harvard en Boston (EE.UU.), en especial a la jefa de área Julie Glowacki, por haberme permitido realizar la estancia predoctoral en su laboratorio y haberme enriquecido tanto. También agradezco a mis compañeros Sara Anderson, Erica Bueno, Shuo Geng y Sherwin Erfani por el tiempo pasado con vosotros.

A todas las personas que han creído en mí, en especial a Elena Amate por tu ayuda, la Dr. Gloria Díaz, que desde México me ha animado tanto, al personal de Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén, en especial a Ana y Ricardo, a los secretarios de departamento Antonio Sancho, Pilar Iglesias, Quite y Angela y al personal de FIBAO. Todos habéis hecho posible que este logro sea hoy una realidad.

A gala, mi perro, porque su cabeza apoyada sobre mis pies mientras escribía a ordenador ha hecho más llevadera esta dura tarea.

D. Alberto Damián Delgado Martínez, Profesor asociado del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén, y Director de la Unidad de Gestión Clínica de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital “Reina Sofía” de Córdoba.

CERTIFICA:

Que D. Jesús Cobo Molinos ha realizado, bajo su dirección, el trabajo titulado” Efecto de ropivacaina y levobupivacaina sobre condrocitos humanos in vitro. Duración de la bupivacaína intraarticular in vivo.”, que presenta como tesis doctoral para la obtención del grado de Doctor.

Jaén, enero de 2014

Fdo:

Dr. Alberto Damián Delgado Martínez.

Los resultados de esta tesis doctoral han sido aceptados y están pendientes de publicación en la siguiente revista (Con indicios de calidad) y comunicaciones a congresos:

Artículo:

ACEPTADO:

Jesús Cobo-Molinos , Mercedes Poncela , Juan A. Marchal-Corrales , Alberto D. Delgado-Martínez. Effect of levobupivacaine on articular chondrocytes in vitro. Eur. J. Anaesth.2014. In press

Indicios de calidad de la revista (según JCR):

- Impact factor 2013: 2.231. Categoría: Anaesthesia. Posición: 12 de 20 Primer cuartil.

Congresos:

- Cobo Molinos, Jesús; Poncela García, Mercedes; Marchal Corrales, Juan A.; Delgado Martínez, Alberto D. Efecto in vitro de la levobupivacaina en cartílago articular humano. Exposición oral. IX Congreso Nacional INVESCOT 2012, Alicante Marzo del 2012
- Delgado Martínez, Alberto D.; Cobo Molinos, Jesús; Poncela García, Mercedes; Marchal Corrales, Juan A. Effect of levobupivacaine on human chondrocytes in vitro. Exposición oral. 13th EFORT International Congress, Berlin Mayo 2012.
- Cobo Molinos, Jesús; Poncela García, Mercedes; Marchal Corrales, Juan A.; Delgado Martínez, Alberto D. Efecto in vitro de bupivacaina, ropivacaina y levobupivacaina en cartílago articular humano. Exposición oral. 49 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología - SECOT'12, Málaga Octubre 2012.
- Cobo Molinos, Jesús; Molina Martínez, Manuel; Poncela García, Mercedes; Delgado Martínez, Alberto D. Efecto in vivo de anestésicos locales en artroscopia de rodilla. Exposición poster. 49 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología -SECOT'12, Málaga Octubre 2012.
- Poncela García, Mercedes; Molina Martínez, Manuel; Cobo Molinos, Jesús; Marchal Corrales, Juan A.; Delgado Martínez, Alberto D. Efecto in vitro de bupivacaina, ropivacaina y levobupivacaina en cartílago articular humano. Exposición oral. Ganador premio accésit en el XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor, Málaga Marzo 2013
- Delgado Martínez, Alberto D.; Cobo Molinos, Jesús; Molina Martínez, Manuel; Poncela García, Mercedes, In vivo dilution of bupivacaine after arthroscopic surgery: an explanation for clinical and experimental disagreement on chondrotoxicity. Aceptación como exposición oral. 15th EFORT International Congress, Londres Junio 2014.

**“Lo único capaz de salvar la vida a un ser humano,
es otro ser humano”**

(Médicos sin Fronteras)

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción.....	15
1.2. Artroscopia de rodilla.....	15
1.2.1. Antecedentes históricos.....	15
1.2.2. Ventajas de la técnica.....	17
1.3.. Técnicas anestésicas para artroscopia de rodilla.....	18
1.3.1. Anestesia local.....	18
1.3.2. Revisión básica de la farmacodinamia de anestésicos locales.....	19
1.3.3. Mecanismo de acción.....	20
1.4. Anestésicos locales.....	21
1.4.1. Bupivacaina.....	21
1.4.1.1. Estructura Química.	
1.4.2. Levobupivacaina.....	22
1.4.2.1.Estructura química.	
1.4.3. Ropivacaina.....	23
1.4.3.1. Estructura Química.	
1.5. Toxicidad y reacciones adversas.....	25
1.5.1 Toxicidad	25
1.5.2 Condrolisis.....	25
1.6. El cartílago como tejido.	27
1.6.1 Tipos de cartílago.....	27
1.6.2. composición del cartílago.....	28
1.6.3. condrocitos.....	28
1.6.4. Estructura.....	29
1.6.5. Lubricación articular.....	30
1.6.6. Factores de crecimiento.....	31

1ª parte: EFECTO DE LA LEVOBUPIVACAINA *IN VITO* SOBRE CONDROCITOS DE CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO

Hipótesis.....	33
Objetivos.....	33
Material y métodos.....	34
Resultados.....	47
Discusión.....	53
Conclusiones.....	57

2ª parte: EFECTO DE LA ROPIVACAINA *IN VITO* SOBRE CONDROCITOS DE CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO.

Hipótesis.....	59
Objetivos.....	59
Material y métodos.....	60
Resultados.....	66
Discusión.....	70
Conclusiones.....	72

3ª parte: EFECTO *IN VIVO* DE LA BUPIVACAINA EN ARTROSCOPIA DE RODILLA.

Hipótesis.....	74
Objetivos.....	74
Material y métodos.....	75
Resultados.....	81
Discusión.....	84
Conclusiones.....	87

CONCLUSION.....	89
-----------------	----

Referencias(BIBLIOGRAFÍA).....	91
--------------------------------	----

ANEXOS.....	96
-------------	----

RESUMEN

RESUMEN

La artroscopia de rodilla es una intervención quirúrgica rutinaria y la administración intra-articular de anestésicos locales en este proceso mejora la analgesia postoperatoria después de una intervención artroscópica, además de proporcionar alivio del dolor a corto plazo. En la actualidad, el analgésico más utilizado es la bupivacaína. Sin embargo, varios estudios recientes han demostrado que incluso una breve exposición a bupivacaína puede resultar condrotóxico. Se han utilizado también ropivacaína y levobupivacaína, desconociéndose actualmente si tienen el mismo efecto condrotóxico que la bupivacaína.

Se realizó un estudio experimental sobre condrocitos humanos cultivados in vitro, obtenidos de muestras de cóndilo femoral de pacientes sometidos a artroplastia total de rodilla. Tras el cultivo de las células, se dividieron en 3 grupos experimentales, bupivacaina, ropivacaina y levobupivacaina.

Se obtuvo significancia en la viabilidad celular a partir de los 30 minutos de exposición a los fármacos obteniendo en bupivacaina un 91.08% de células vivas con respecto a las que habían estado en contacto con levobupivacaína (89.98% viabilidad) y ropivacaína (86.66% viabilidad)

Los resultados indican que la exposición a levobupivacaina y ropivacaina en las dosis clínicas usadas normalmente en quirófano, durante más de 60 minutos, es tóxica para cultivos de condrocitos articulares humanos. La bupivacaína, por lo contrario, demuestra en nuestro estudio, ser menos tóxica que la levobupivacaína.

Se realizó también un estudio in vivo sobre 15 pacientes sometidos a artroscopia de rodilla para comprobar si las concentraciones del fármaco se mantenían estables durante mucho tiempo tras la infiltración. A los 15 pacientes se les inyectó una dosis de bupivacaina (0.5%) intraarticular justo tras la artroscopia. Se obtuvieron muestras de líquido sinovial a los 15, 30 y 60 minutos tras la administración de la bupivacaína obteniendo los siguientes resultados:

La concentración de bupivacaína (0,5%) disminuyó a 61.6 % en el minuto 0 (control) por dilución, en el minuto 15 fue de 57.5%, en el 30 de 55.8% y a los 60 minutos de 40.6% .

En conclusión, la ropivacaina y levobupivacaina son tan condrotóxicas como la bupivacaína, no representando en la actualidad una alternativa a la bupivacaína en este sentido. La condrotoxicidad de la bupivacaína es prácticamente nula tras infiltración única en el postoperatorio de rodilla porque los niveles del fármaco decrecen rápidamente en la rodilla, con lo que el efecto clínico condrotóxico es mínimo y aceptable en la práctica cotidiana.

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

La administración intra-articular de anestésicos locales, es un proceso utilizado en clínica para mejorar la analgesia postoperatoria después de una intervención artroscópica, como método anestésico para la reducción de bloqueos meniscales, como prueba de diagnóstico, o, junto a corticoides, para proporcionar alivio del dolor a corto plazo. Esta técnica ha demostrado un efecto analgésico eficaz, fiable y seguro del dolor postoperatorio. (Kamath, 2008)

Los anestésicos locales producen en el paciente un bloqueo reversible de la conducción de impulsos nerviosos, de forma que la función sensitiva o motora de las fibras nerviosas queda inhibida transitoriamente. Este bloqueo del impulso nervioso varía en función del agente anestésico utilizado. Pasado este efecto, la recuperación de la función nerviosa es completa.

1.2. Artroscopia de rodilla

1.2.1. Antecedentes históricos.

Dentro de la medicina moderna, la endoscopia en la práctica clínica comenzó a realizarse a comienzos del siglo XIX, en concreto en 1805 por el doctor en medicina Philip Bozzini, quien realizó un instrumento llamado "linchleiper". Esta herramienta fue utilizada para el examen de aberturas naturales del organismo como, el canal anal, nasofaríngeo, el recto, la vejiga, la uretra y el interior de los huesos infectados por osteomielitis. Aunque no tuvo una importancia clínica significativa ni reconocimiento público si fue el germen del hoy conocido como endoscopio (Figura 1).

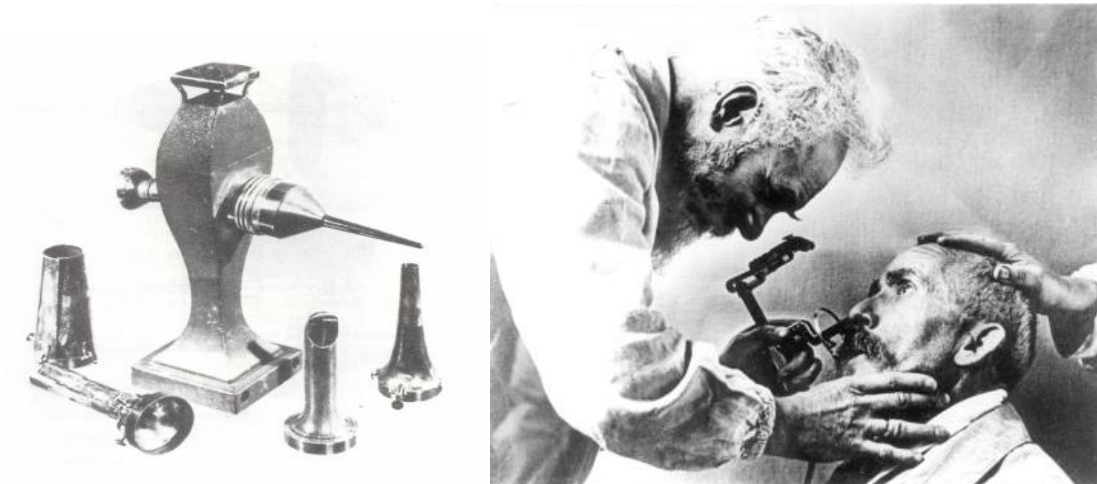


Figura 1 uso del Linchleiper durante el siglo XIX

Ya a principios del siglo XX, las graves infecciones que se producían en las articulaciones, sobre todo debidas a la tuberculosis y las enfermedades reumáticas, inundaban el mundo de la Cirugía Ortopédica, por lo que fue necesario el tener que comenzar de nuevo a usar terapias y medios rudimentarios para atajar estos males (Chassaing, 1987). Pero el desarrollo y perfeccionamiento del artroscopio como lo conocemos hoy en día, fue el resultado de la iniciación de la cirugía artroscópica de la rodilla, a través de un trabajo publicado por Geist (1926) al realizar una biopsia sinovial a través de la artroscopia.

El Doctor Watanabe durante el año 1962, fue el pionero en realizar una meniscectomía. Este logro fue el impulso y desarrollo para que los doctores Jackson O'Connor y Dandy comenzaran a desarrollar estas técnicas y poco a poco, hacer que la cirugía artroscópica se haya convertido en una técnica imprescindible para las lesiones de la rodilla. En la actualidad son múltiples los autores que publican los buenos resultados obtenidos mediante esta técnica. (Koene, 1982).

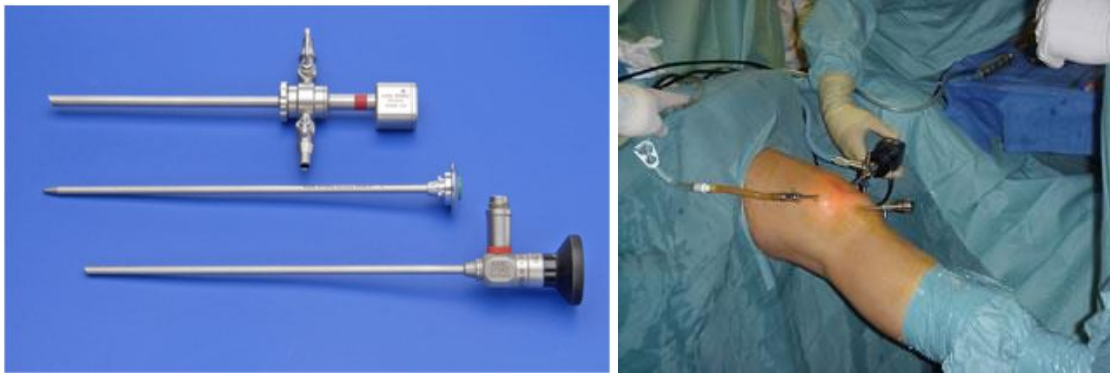


Figura 2. Artroscópico en la actualidad

1.2.2. Ventajas de la técnica.

La cirugía artroscópica como la conocemos hoy en día ha experimentado un progreso especialmente rápido. El artroscopio como instrumento quirúrgico ha permitido que el cirujano ortopédico pueda abordar el diagnóstico y el tratamiento de los diversos procesos articulares en un paciente. Dentro de la articulación en la que la artroscopia alcanza mayor ampliación diagnóstica y terapéutica es la rodilla. La creciente popularidad de estas técnicas artroscópicas ha a dado paso a poder demostrar su utilidad diagnóstica en ciertos procedimientos como reparación meniscal, meniscectomía, o reconstrucción de ciertos ligamentos, etc.

Las ventajas de la artroscopia superan a las posibles desventajas que se puedan encontrar, de este modo se puede decir que ayuda a la reducción de la morbilidad postoperatoria, se realizan incisiones mínimas a la hora de realizar la técnica, en concreto sólo dos portales (en la mayoría de los casos). Las posibles respuestas inflamatorias tras la práctica son mínimas, se pueden realizar diagnósticos muy precisos, se reduce el coste hospitalario del paciente y la rehabilitación e incorporación de los pacientes a su vida cotidiana aumenta. (Chassaing 1987). Aunque la cirugía artroscópica de rodilla es una técnica poco invasiva es de destacar que no está libre de ciertas complicaciones, aunque se presentan en muy pocos casos.

La integridad de la cápsula articular es importante porque facilita la distensión articular mediante la infusión de líquido a presión, mejorando de esta manera la visión intraarticular. Aunque no es esencial, en la mayor parte de los casos la artroscopia se realiza con cápsula íntegra. Si se utiliza en las roturas de la cápsula y en fracturas articulares no se debe utilizar líquido a presión ya que el fluido podría discurrir por los tejidos blandos, saliendo de la

articulación y produciendo síndromes compartimentales. La integridad de la cápsula durante la intervención es importante para poder mantener la presión del líquido intraarticular que se infunde durante la misma, lo que mantiene separadas las superficies articulares e incrementa el área de visión. Esta misma integridad de la cápsula es la que permite que, tras la realización de la misma, todo lo que se inyecte dentro de la articulación permanezca dentro de ella, como por ejemplo los fármacos usados para la anestesia postoperatoria, como bupivacaína, ropivacaína o levobupivacaína.

1.3. Técnicas anestésicas para artroscopia de rodilla.

La artroscopia de rodilla es una técnica que a menudo puede ser realizada en pacientes con patológica benigna de rodilla, por lo que se debe minimizar los posibles riesgos de la técnica anestésica que utilizemos. La anestesia que se utiliza para la artroscopia de rodilla debería facilitar en la medida de lo posible al cirujano el poder visualizar y manipular de forma clara toda la articulación requerida para la intervención quirúrgica, sin interferir al bienestar del paciente durante la intervención.

Existen diferentes técnicas y métodos anestésicos, desde la anestesia local hasta la anestesia general, incluyendo también ciertas técnicas regionales. Teniendo en cuenta las características de la cirugía que se va a realizar, los objetivos de la técnica anestésica deberían ser mínimamente invasivos, tener pocos efectos adversos y tener una alta satisfacción por parte del paciente.

1.3.1. Anestesia local.

La anestesia local dentro de la artroscopia de rodilla es un proceso muy bien documentado bibliográficamente, ofreciendo ventajas frente a otros tipos de anestesia. La anestesia local permite realizar ciertas intervenciones sin necesidad de anestesiarse por completo al paciente eliminando el riesgo que esto conlleva.

Normalmente para llevar a cabo la anestesia, se infiltra el anestésico local en la cavidad de la rodilla y también en los portales realizados para introducir el instrumental quirúrgico. Durante la inyección del anestésico local, la mayoría del anestésico debería ser inyectado hacia el plano subcutáneo y no en el plano subcapsular, ya que la grasa ocuparía

parte de la articulación, dificultando la visualización inicial. Los anestésicos utilizados de entrada van acompañados de adrenalina, de esta forma se disminuye la cantidad de sangre en el campo quirúrgico (De Andrés, 2000). Pasados 20 minutos tras la inyección del anestésico local, la cirugía podría iniciarse.

Una de los problemas con la anestesia local es el tiempo de latencia (tiempo desde la inyección del fármaco hasta que aparece su efecto clínico), ya que se precisará más tiempo para poder iniciar la cirugía, además de conseguir una anestesia insuficiente, por lo que sería mal tolerada por el paciente en procedimientos largos y cuando se precisara manipular la articulación.

No todos los procedimientos ni todos los pacientes son candidatos a este tipo de anestesia. Se necesitan pacientes tranquilos, con rodilla relativamente laxa (para que se pueda movilizar), y las técnicas deben ser exclusivamente intraarticulares (meniscectomías, diagnósticas, etc), ya que la zona anestesiada es exclusivamente intraarticular.

1.3.2. Revisión básica de la farmacodinamia de anestésicos locales.

Los anestésicos locales se administran de diferente forma según la intervención que se vaya a realizar, así se podrá administrar directamente en el nervio, en zonas próximas a este o en el tejido propiamente dicho. La función que ejercen es una acción de inhibición de la generación y conducción del impulso nervioso por medio de un bloqueo de los canales sodio-voltaje-dependientes de la membrana de las células, en este caso nerviosas. La entrada de sodio produce una disminución de la diferencia de potencial hasta llegar a niveles donde no se es capaz de excitar la membrana en reposo colindante y generar un nuevo potencial de acción. Este bloqueo nervioso propiamente dicho, sigue siempre el mismo orden:

- Inicialmente pérdida de funciones autónomas
- Posteriormente analgesia
- Y por último pérdida de funciones sensoriales y anestesia.

La estructura molecular de los anestésicos locales están principalmente caracterizados por tener en un extremo una cadena lipofílica y en el otro extremo una cadena hidrofílica, conectados a una cadena de hidrocarburos. La unión entre la cadena hidrocarbonada y el anillo aromático lipofílico, va a determinar la clasificación de los anestésicos locales en tipo éster (-CO-) o tipo amida (-NHC-).

1.3.3. Mecanismo de acción.

La principal acción de los anestésicos locales es, como ya se ha comentado anteriormente, la de bloquear la conducción nerviosa alterando la propagación del potencial de acción en los axones, de modo que no se alcanza el potencial umbral.

Los anestésicos locales pueden interactuar de forma directa con los receptores específicos del canal de Na⁺, inhibiendo el flujo de Na⁺ hacia el interior. La molécula de anestésico debe atravesar la membrana celular mediante una difusión pasiva no iónica de la molécula sin carga, y después unirse al canal de Na⁺ en su forma ionizada o con carga (Figura 3).

La inhibición de estos canales de Na⁺ aumenta tras despolarizaciones repetidas en un bloqueo llamado bloqueo fásico (Lee-Son et al., 1992). Esto representa un aumento en la unión del anestésico, bien porque existen canales accesibles durante la despolarización o bien porque las modificaciones del canal por la despolarización unen al anestésico con mayor afinidad.

La concentración mínima del anestésico que bloquea la conducción del impulso nervioso un tiempo determinado se denomina concentración inhibitoria mínima. Esta es variable para cada tipo de anestésico local y es una medida de potencia análoga a la concentración alveolar mínima de los anestésicos inhalados.

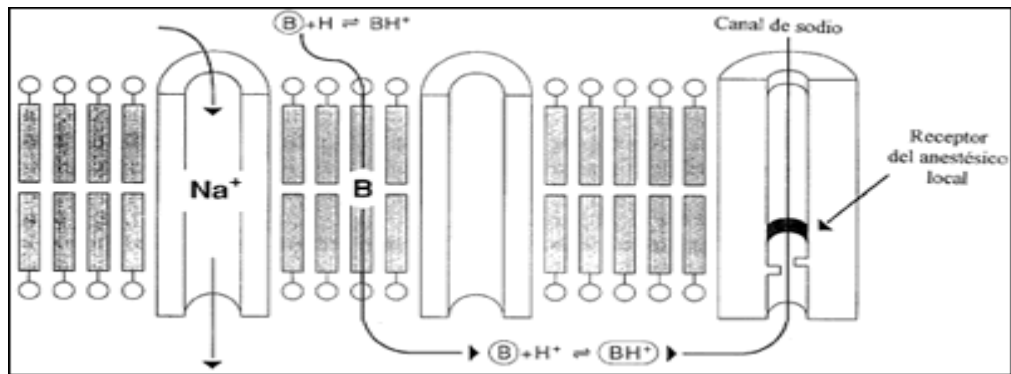


Figura 3. Mecanismo de acción de los anestésicos locales. B= Base (fracción no ionizada, liposoluble); BH= Cation (fracción ionizada, hidrosoluble).

1.4. Anestésicos locales

1.4.1. Bupivacaina.

En la actualidad, el anestésico local más utilizado vía intraarticular es la bupivacaina. Se trata de un anestésico local tipo amida. Aunque tiene un inicio de acción moderadamente lento, su efecto es más duradero comparado con otros anestésicos locales. Suelen ser utilizados en técnicas de bloqueo nervioso a nivel local. Se pueden administrar en forma de dosis única a nivel de un plexo nervioso o nervio periférico previamente a una intervención quirúrgica. De esta forma se pretende conseguir un doble objetivo: la anestesia durante el acto quirúrgico y el control del dolor en el postoperatorio inmediato. La dosis más comúnmente utilizada sería al 0.5%.

La bupivacaína es casi absorbida en su totalidad desde el lugar de su administración, y esta velocidad de absorción es variable según unos parámetros, en especial depende de la vascularización de la zona de administración. El proceso de alcalinización de bupivacaína con bicarbonato sódico produce la disminución en el tiempo de inicio de acción y de esta forma prolonga el efecto analgésico sin incrementar la absorción sistémica de bupivacaína en el bloqueo del nervio.

1.4.1.1. Estructura Química.

La bupivacaína como molécula, fue sintetizada en el año 1957. Y se encuentra estrechamente relacionada con otros anestésicos locales tipo amida como puede ser la lidocaina, o la mepivacaína (la diferencia radica en que la bupivacaína posee un grupo metilo y la mepivacaína posee un grupo butilo). Su peso molecular es de 288 Daltons.

La Bupivacaína posee una estructura química compuesta por un anfótero, del que forman parte un grupo hidrofílico (amina terciaria) -anillo piperidínico con un grupo butilo unido al N piperidínico- y un grupo hidrofóbico (anillo bencénico), unidos por una cadena intermedia con un enlace tipo amida. Figura 4.

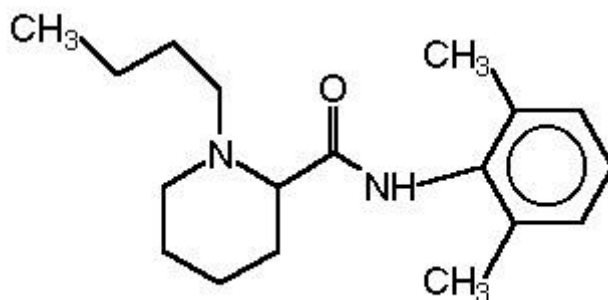


Figura 4. Estructura química bupivacaína

1 butil-N-(2,6-dimetilfenil)-2-piperidinocarboxamida.

Es un anestésico local que produce un bloqueo reversible de la conducción de los impulsos nerviosos, impidiendo la propagación de los potenciales de acción en los axones de las fibras nerviosas autónomas, sensitivas y motoras.

1.4.2. Levobupivacaína.

En la búsqueda de alternativas menos cardiotoxicas que la ya conocida bupivacaína, se ha centrado el estudio en anestésicos locales tipo amida con estereoespecificidad como es el caso de la ropivacaína y la levobupivacaína, isómeros S de bupivacaína, y que presentan

menos efectos adversos que la bupivacaína. (Morrison et al., 2000; Tetzlaff, 2000; Burlacu, 2008; Zink, 2008).

No obstante, tanto bupivacaína como ropivacaína producen una anestesia muy efectiva en quirófano. Por otra parte, levobupivacaína parece ofrecer otras ventajas en cuanto a la seguridad cuando se requieren altas dosis de anestésico local. (Mather, 2005).

1.4.2.1. Estructura química.

La levobupivacaína es el enantiómero S(-) de la bupivacaína, y está disponible comercialmente como clorhidrato de levobupivacaína (figura 3), con peso molecular 324,9 y pKa 8,09, similar a bupivacaína racémica.

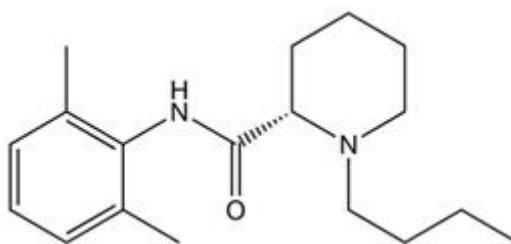


Figura 5. Estructura química levobupivacaína.

C₁₈H₂₈N₂O.HCl

1.4.3. Ropivacaína.

Una alternativa prometedora al uso de la bupivacaína, para el tratamiento del dolor intra-articular, es la ropivacaína.

La ropivacaína fue sintetizada en 1957 por primera vez, pero no se registró y utilizó en el ámbito clínico hasta 1996, cuando ya fue publicada su revisión farmacológica. Originalmente se eligió el enantiómero S(-) ya que poseía mayor duración de acción respecto al R(+). Posteriormente se pudo comprobar que existía una menor acumulación en los canales de

sodio, disociándose más rápido y produciendo menor efecto adverso que la bupivacaína. Por lo tanto, la ropivacaína fue el primer anestésico local puro disponible para su uso clínico (Markham 1996).

1.4.3.1. Estructura Química.

La Ropivacaína, es un aminoácido de acción prolongada del grupo de las pipercoloxilidida, que difiere de la bupivacaína sólo por la sustitución de su grupo butilo en el átomo de nitrógeno. Esta variación molecular hace menos soluble a la ropivacaina que la bupivacaina es decir, se reduce su capacidad para difundir al corazón o al sistema nervioso. Su peso molecular es de 274 Daltons.

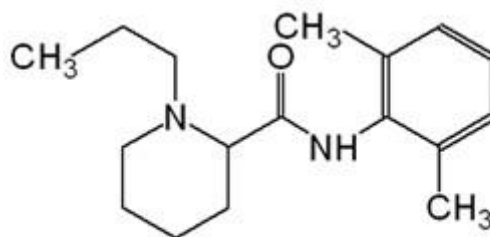


Figura 6. Estructura química ropivacaína

(S)-N(2,6-dimetilfenil)-1-propil-2-piperidinocarboxamida

Como comparativa entre los dos fármacos, la ropivacaína es conocida por tener menos toxicidad sistémica que la bupivacaína, aunque con una potencia menor, por lo que se utilizan mayores dosis. La ropivacaína ha sido estudiada también, para analgesia postoperatoria en artroscopia de rodilla por Piper S. L. (2008), mostrando mayor eficacia que la bupivacaína a la hora de proporcionar alivio del dolor. Sin embargo, la ropivacaína intraarticular también es condrotóxica. Grishko et al (2010) concluyeron en un estudio reciente, que tanto la lidocaina, como la bupivacaina y ropivacaina son condrotóxicos, en cultivos a diferentes concentraciones. Sin embargo, este efecto parece depender del tiempo en el que dichas células están sometidas al fármaco. Chu et al (2008) y Piper et al (2008) demostraron que la ropivacaina no es condrotóxica en estudios in vitro, cuando la ropivacaina se mantiene durante menos de 1 hora,

al contrario que la bupivacaína, que manifiesta efectos tóxicos, incluso con breves exposiciones (Chu 2008, Piper, 2008).

1.5. Toxicidad y reacciones adversas.

Los posibles efectos tóxicos que producen los anestésicos locales de la familia de la bupivacaína, normalmente vienen relacionados con la dosis administrada y son generalmente infrecuentes, aunque si es verdad que en recientes estudios in vitro, se ha demostrado que incluso una breve exposición a bupivacaína, puede resultar condrotóxica. (Piper, 2008).

Como fármaco, la bupivacaína, posee un estrecho margen terapéutico, ya que se considera como tóxica una concentración de bupivacaína plasmática a partir de 2-4 µg/ml

1.5.1 Toxicidad

La toxicidad que produce la administración de anestésicos locales es conocida desde hace tiempo (Albright, 1979), sin embargo, no es muy frecuente que estas ocurran.

Los anestésicos están relativamente libres de efectos adversos y pueden ser administrados en dosis apropiadas y en su correcta localización anatómica. Pero si que pueden producirse ciertas reacciones sistémicas o localizadas.

Los anestésicos locales difieren en su farmacología, por ello pueden darse ciertos efectos adversos específicos para determinados fármacos, como reacciones alérgicas a los aminoésteres.

1.5.2 Condrolisis.

Otro concepto es la condrolisis. Se trata de la destrucción de la zona de cartílago articular, en la que se produce una muerte generalizada de los condrocitos en un relativo período de tiempo, tras el contacto del cartílago con el agente condrotóxico. Esto conduce a la pérdida rápida y progresiva del cartílago, degenerando la zona de la articulación tratada. Chu et al. y Gomoll et al han estudiado los efectos de la exposición de la bupivacaína, tanto en cultivo celular y en explantes osteocondrales (Chu et al), como in vivo en un modelo animal, que representa de cerca la situación clínica de la administración de bupivacaína a través de un catéter, durante un tiempo determinado (Gomoll et al). Ambos estudios demostraron una

toxicidad significativa sobre los condrocitos, con la muerte de muchas células en la zona tratada y una disminución de su metabolismo (Gomoll, 2009) (Chu, 2006).

Este efecto condrotóxico de la bupivacaína, ha sido observado también en estudios clínicos en pacientes jóvenes en diferentes articulaciones, tales como cadera, rodilla, tobillo y hombro. Se ha observado que se desarrolla la condrolisis, generalmente después del tratamiento de la inestabilidad del hombro o tras ser sometidos a una intervención de artroscopia en las articulaciones antes mencionadas. En todos estos pacientes se usó una infusión continua postoperatoria de un anestésico local con adrenalina, durante al menos 72 h (Webb, 2009)

Una alternativa prometedora al uso de la bupivacaina, para el tratamiento del dolor intra-articular, es la ropivacaína. La Ropivacaína, es un aminoácido de acción prolongada del grupo de las pipercoloxilidida, que difiere de la bupivacaína sólo por la sustitución de su grupo butilo en el átomo de nitrógeno. Esta variación molecular hace menos soluble a la ropivacaina que la bupivacaina es decir, se reduce su capacidad para difundir al corazón o al sistema nervioso. Como resultado, la ropivacaína es conocida por tener menos toxicidad sistémica que la bupivacaína, aunque con una potencia menor, por lo que se utilizan mayores dosis. La ropivacaína ha sido estudiada también, para analgesia postoperatoria en artroscopia de rodilla por Piper S. L. (2008), mostrando mayor eficacia que la bupivacaína a la hora de proporcionar alivio del dolor. Sin embargo, la ropivacaína intraarticular también es condrotóxica. Grishko et al (2010) concluyeron en un estudio reciente, que tanto la lidocaina, como la bupivacaina y ropivacaina son condrotóxicos, en cultivos a diferentes concentraciones. Sin embargo, este efecto parece depender del tiempo en el que dichas células están sometidas al fármaco. Chu et al (2008) y Piper et al (2008) demostraron que la ropivacaina no es condrotóxica en estudios in vitro, cuando la ropivacaina se mantiene durante menos de 1 hora, al contrario que la bupivacaína, que manifiesta efectos tóxicos, incluso con breves exposiciones (Chu 2008, Piper, 2008).

Recientemente, se ha introducido en la práctica clínica la levobupivacaína, que es un anestésico local cuyas características anestésicas serían semejantes a las de la bupivacaína, con la ventaja de presentar un riesgo de toxicidad cardiovascular y del sistema nervioso

central, similar al de la ropivacaína. La Levobupivacaína es un anestésico del tipo de las amino-amidas, que se introdujo en la práctica clínica tras observarse los posibles efectos colaterales con el uso de la bupivacaína.(Gomoll 2009, Cappelleri 2005).

No se conoce en la actualidad el efecto sobre los condrocitos de la levobupivacaína, El objetivo de este estudio, es valorar el efecto que diferentes tiempos de aplicación de levobupivacaína tienen sobre el cartílago articular. (Baskan 2010)

1.6. El cartílago como tejido.

Recubre los extremos epifisarios, facilitando el deslizamiento y amortiguando las presiones mecánicas.

Es de coloración blanca o amarillenta, brillante y homogéneo al corte.

Posen un grosor de 2-4 mm de la cadera y la rodilla. El grosor se correlaciona con la congruencia de la articulación: a mayor congruencia, menor grosor del cartílago.

La capacidad de regeneración del cartílago hialino esta reducida por la ausencia de vascularización. Esto limita la producción de una respuesta inflamatoria que desencadene los procesos de reparación.

1.6.1. Tipos de cartílago.

Fibrocartílago:

De predominio fibrilar. Se encuentra en meniscos, pubis, discos intervertebrales, rodete acetabular y glenoideo y en las zonas de reparación del cartílago hialino.

Cartílago elástico:

Posee mayor cantidad de fibras elásticas. Se halla en el pabellón auricular, en epiglotis y la laringe.

Cartílago Hialino:

Está presente en las superficies articulares en general, el esqueleto fetal, el árbol traqueobronquial, la nariz, etc. Es hasta 20 veces más rígido que los anteriores.

1.6.2 composición del cartílago

Matriz:

Almacén de fibras colágenas de cuya red está la sustancia fundamental.

Fibras colágenas:

El colágeno supone el 50% del peso seco del cartílago articular. El de tipo II constituye el 90-95% del colágeno. El colágeno de tipo II también se encuentra en el núcleo pulposo de los discos intervertebrales; es más compacto y resistente a enzimas proteolíticas que el de tipo I.

Se sintetiza en el retículo endoplasmático de los condrocitos y aporta, sobre todo, resistencia a las fuerzas de tracción y cizallamiento.

El colágeno tipo VI aumenta en las fases precoces de la artrosis.

Otros constituyentes:

Se encuentran presentes también, glucoproteínas enlazando proteoglicanos con moléculas de ácido hialurónico y lípidos alrededor de los condrocitos sobre todo en las capas superficiales ya que ayudan a la lubricación.

1.6.3. Condrocitos.

Ocupan solo el 1-10% del volumen tisular y es el único tipo celular que se encuentra en el cartílago hialino. El condrocito en edad adulta no posee la propiedad de reproducirse por mitosis.

Las principales funciones del condrocito son:

-
- Síntesis de la matriz: colágeno solo durante el desarrollo y proteoglicanos también en la edad adulta. Para sus requerimientos metabólicos, dependen de la entrada y salida de líquido sinovial en la matriz.
 - Fagocitosis: se han visto granulos de hierro intracitoplasmáticos en caso de hemartros.
 - Poseen encimas para la degradación del cartílago: proteasas, exogluconasas y colagenasas en algunos casos.

1.6.4. Estructura.

Zona I o superficial:

Constituye el 10-20% del espesor total del cartílago. En contacto con el líquido sinovial, forma la parte de deslizamiento. Contiene fibras de colágeno paralelas a la superficie articular. Posee condrocitos aplanados con forma de disco. Presenta gran resistencia a la fricción.

Zona II o intermedia:

Es la capa más gruesa; supone el 40-60% de espesor, contiene fibras de colágeno en direcciones variablemente oblicuas, formando una red no orientada. Presenta escasos condrocitos con forma esférica. Posee una dureza intermedia.

Zona III o profunda:

Representa el 30% del espesor del cartílago. Las fibras de colágeno se disponen perpendiculares a la superficie articular. Los condrocitos, de mayor volumen, se apilan en columnas.

Zona IV o cartílago calcificado:

Constituye el 5-10% del grosor total. Los condrocitos se disponen radialmente, rodeados de matriz calcificada con una alta concentración de sales de calcio y pocos proteoglicanos. Los condrocitos en esta capa sintetizan colágeno tipo X y fosfatasa alcalina; ayudan al proceso de mineralización de la matriz extracelular. Los límites de esta zona son la

línea de cemento por debajo y la línea de calcificación (tidemark) por arriba. La línea de calcificación es la que separa la zona del cartílago que recibe la vascularización desde el hueso subcondral y la zona que se nutre por difusión de líquido articular y , por lo tanto, determina el punto sobre las lesiones condrales pueden cicatrizar (Delgado 2012).

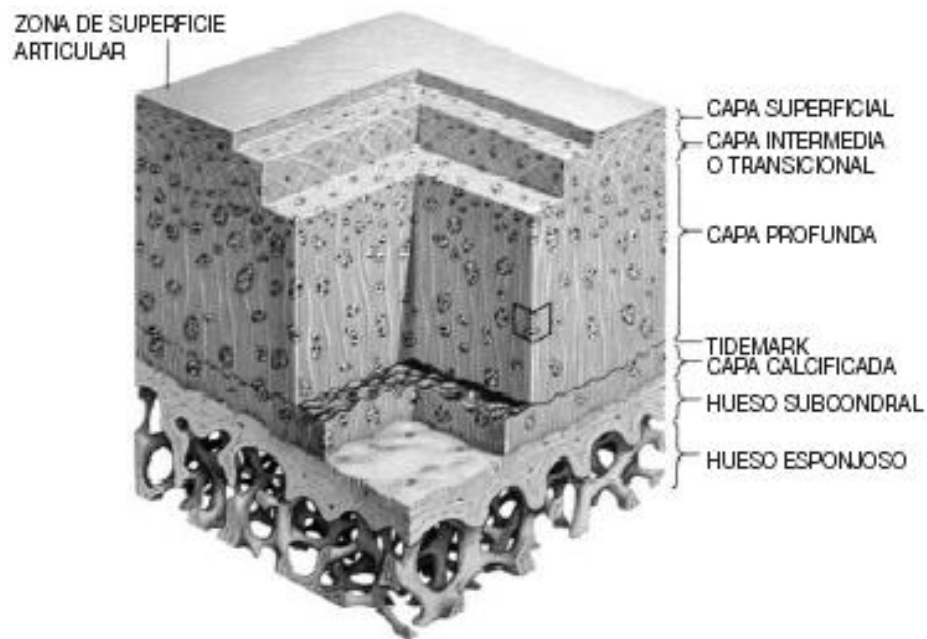


Figura 7. El cartílago está formado por dos unidades básicas y fundamentales, las células, llamadas condrocitos, y la matriz.

1.6.5. Lubricación articular.

El coeficiente de rozamiento de una articulación humana es muy bajo: 0.002 a 0.04.

A bajas presiones, hay distintos factores que ayudan a disminuir el coeficiente de fricción entre superficies articulares; es lo que se denomina lubricación elastohidromecánica.

- Líquido sinovial, que forma una película lubricante, en la que colabora de manera predominante la lubricina, glucoproteína segregada por los sinoviocitos.
- Deformación elástica del cartílago articular

-
- El flujo de determinadas sustancias que produce el cartílago.

A altas presiones, las superficies articulares se deslizan sobre el agua que el propio cartílago expulsa. A este fenómeno se le llama weeping lubrication.

1.6.6. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento regulan los procesos de síntesis en el cartílago normal y están implicados en la degeneración artrósica.

PDGF

Factor de crecimiento derivado de plaquetas. Desempeña un posible papel en la reparación de las laceraciones del cartílago.

TGF- β

Factor de crecimiento transformante β que inhibe la síntesis de colágeno tipo II, estimula la síntesis de proteoglicanos y estimula la formación de inhibidores de las metaloproteinas que previenen la degradación del cartílago.

FGF-b

Factor de crecimiento fibroblástico básico. Estimula la síntesis de ácido dexosirribonucleico (ADN) de los condrocitos del cartílago del adulto, influyendo en la reparación del cartílago.

IGF

Factor de crecimiento derivado de la insulina, de tipo I y de tipo I. Estimula la síntesis de ADN y matriz cartilaginosa en el cartílago del adulto y en el cartílago de crecimiento en niños.

1ª parte: EFECTO DE LA LEVOBUPIVACAINA *IN VITO* SOBRE CONDROCITOS DE CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO.

1ª parte: EFECTO DE LA LEVOBUPIVACAÍNA *IN VITRO* SOBRE CONDROCITOS DE CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO.

Hipótesis:

- 1.- La levobupivacaína es menos tóxica que la bupivacaina para los condrocitos humanos.
- 2.- La condrotoxicidad de la levobupivacaína, es dependiente del tiempo de exposición al fármaco.

Objetivos:

- 1.- Medir y comparar la condrotoxicidad de los anestésicos bupivacaina y levobupivacaina aplicados a una concentración de 0,5%, en cultivos de condrocitos humanos *in vitro*.
- 2.- Medir la condrotoxicidad de los mismos según el tiempo de exposición al fármaco: 15 min/30 min/ 60 min

2. Materiales y métodos.

2.1 Diseño del estudio.

El estudio fue presentado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la provincia de Jaén. Ver ANEXO I.

Así mismo para el trabajo de laboratorio se presentó y fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la Universidad de Jaén la utilización de muestras de origen humano, no embrionarias ni fetales, en estos ensayos. ANEXO II.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les explicó el propósito del mismo y su metodología, y aceptaron participar en el mismo (ANEXO III).

Se diseñó un estudio observacional, de una cohorte de diez pacientes, dentro del contexto de una intervención clínica rutinaria de pacientes sometidos a una técnica de anestesia e intervenidos de prótesis de rodilla. ANEXO III.

Los estudios in vitro no precisan un número elevado de pacientes, ya que las técnicas de laboratorio no tienen tanta variabilidad como las variables clínicas. 10 pacientes es la muestra más utilizada en estudios similares (Bruce 1989, Piper 2008)

2.2. Reclutamiento de pacientes

2.2.1. Protocolo del estudio

Los sujetos candidatos a participar en el estudio debían cumplir todos los siguientes *criterios de inclusión*:

- Pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 50 y 80 años.
- Pacientes iban a ser sometidos a intervención quirúrgica de artroplastia total de rodilla primaria (implantación de una prótesis de rodilla) por gonartrosis.

No se incluyeron en el estudio ningún sujeto que presentara alguno de los siguientes *criterios de exclusión*:

- Pacientes con alergia a algunos de los anestésicos locales empleados.

-
- Paciente con infección.
 - Paciente que expresase su negativa a participar en el estudio.

2.2.2. Fármacos utilizados.

Los fármacos de estudio utilizados en nuestro estudio clínico fueron los siguientes:

- Levobupivacaína (Chirocane) 0,5% (10 ml). Lab. Abbott
- Bupivacaína (Inibsacain) al 0,5% (10 ml). Lab. Inibsa

2.3. Recogida de muestra de cartílago.

Se usaron para los diferentes ensayos, condrocitos humanos obtenidos 10 pacientes, sometidos a intervenciones quirúrgicas de reemplazo total de rodilla, en el servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología (COT) del Complejo Hospitalario de Jaén (CHJ). El cartílago, se aisló de los cóndilos femorales de los pacientes intervenidos, recogiendo solo el cartílago sano y desechando aquel que se encontraba dañado. Este proceso se realizó en condiciones estériles, realizándose las técnicas necesarias para disgregar los tejidos señalados tales como raspado de la superficie del cóndilo para extraer el cartílago sano y posteriormente su disgregación en pequeños trozos de 1 cm de tamaño para facilitar el proceso de obtención de las células. De esta forma que se obtuvieron y mantuvieron en cultivo un número de condrocitos suficientes para su uso en este proyecto.

Las muestras recogidas en quirófano, se transportaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium al 1% de antibióticos (gentamicina y ampicilina. Este medio viene descrito en el siguiente apartado de "preparado de medios de cultivo"), y se mantuvieron a 4°C hasta su procesado en los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén. El tiempo de traslado de la muestra desde el quirófano al laboratorio no excedió más de dos horas para evitar algún tipo de degradación o contaminación en la muestra.

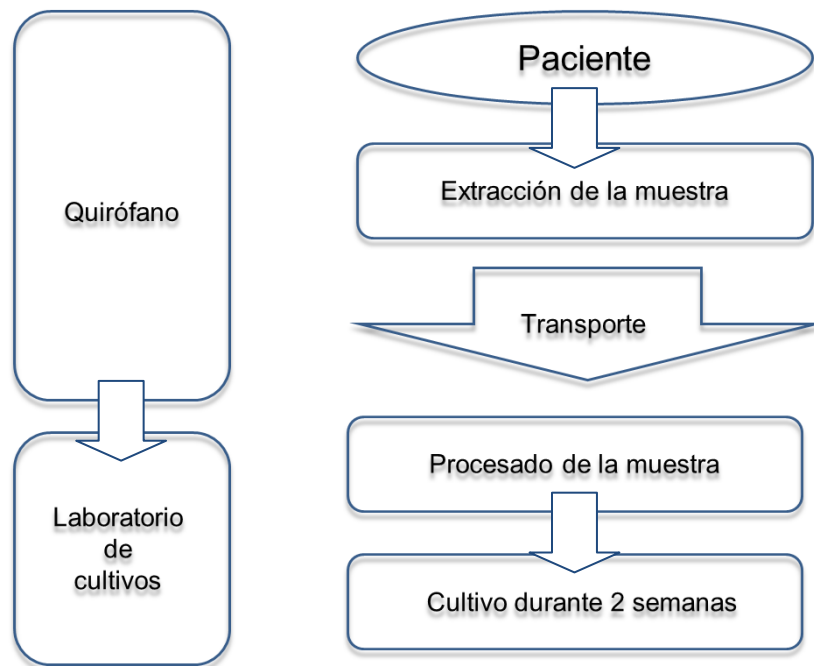


Figura 2.1. Esquema de toma, procesamiento y determinación de las muestras.

2.4. Preparado de medios de cultivo

En este apartado se describe la composición de los medios de cultivo empleados. Los medios de cultivo ayudan por una parte, a la adaptación de la célula al ambiente *in vitro*, y por otra parte también facilita, gracias a sus elevados nutrientes y factores de crecimiento, que la célula se desarrolle de forma correcta durante el tiempo de cultivo:

2.4.1. Medios generales de cultivo

- Medio de cultivo general DMEM completo

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) es un medio comercial, de la casa farmacéutica Sigma, constituido por nutrientes y factores de crecimiento que favorecen el desarrollo y viabilidad de células en cultivo *in vitro*. Este medio completo fue el sustrato empleado para cultivar los condrocitos durante las dos semanas que se mantuvieron en cultivo.

El medio comercial se mantiene a 4° C y viene sin complementar. Para su utilización en cultivos celulares es necesario complementarlo añadiendo antibióticos y Suero fetal bovino (FBS) en las siguientes proporciones:

Medio de cultivo DMEM (Sigma).....500 ml

Antibióticos:

Gentamicina (lab. Normon).....0.05 mg/ml

Ampicilina (Lab. Normon).....0.083 mg/ml

FBS (Sigma).....100 ml

2.4.2. Medios específicos de cultivo

Los medios de cultivo específicos son aquellos que ayudan a la célula a adaptarse al cultivo in vitro. Se utilizan durante las primeras 24 horas de cultivo y pasado este tiempo, las restantes dos semanas de cultivo se usa el medio de cultivo general anteriormente citado.

• Medio de transporte de cartílago

El medio de transporte fue utilizado para mantener el cartílago extraído al paciente en quirófano y conservarlo en las mejores condiciones de viabilidad durante su traslado desde el quirófano al laboratorio. El tiempo transcurrido fue de aproximadamente unas 4 horas desde su extracción. Se trata de un medio rico en antibióticos y debe mantenerse a 4°C.

Se usaron dos frascos de 15 ml con:

DMEM (Sigma).....10 ml

Antibióticos P/S (Sigma).....100 mg/ml

• **Medio de cultivo de condrocitos al 10% de suero fetal bovino.**

El medio de cultivo al 10% de suero se utiliza solo cuando se esta disgregando las células del tejido, al estar en una proporción baja de suero fetal bobino, se puede usar para hacer lavados de células y mantenerlas durante el tiempo de manipulación antes de ser sembradas y cultivadas definitivamente.. Su composición es la siguiente.

DMEM (Sigma).....500 ml

Antibióticos:

Gentamicina (Lab. Normon).....0.05 mg/ml

Ampicilina (Lab. Normon).....0.083 mg/ml

DNAsa I (Sigma)6 µl

Insulina Humana (Actrapid).....7 ml

FBS (Sigma).....50 ml

• **Medio de cultivo de condrocitos al 20% de suero fetal bovino.**

Una vez que hemos obtenido las células del tejido, y las queremos sembrar, utilizamos medio de cultivo al 20% de suero fetal bobino, este suero es un poco más rico en nutrientes que el medio de cultivo al 10% y favorece la toma de contacto de la célula con el medio in vitro. Este medio fue utilizado para el cultivo de los condrocitos durante las primeras 24 horas tras el aislamiento. Su composición es la misma al anterior pero suplementado con un 10% más de FBS.

Pasado 24 horas tras la siembra celular, se eliminó el medio de cultivo al 20% y se utilizó medio de cultivo completo descrito anteriormente y que nos sirvió durante todo el periodo de cultivo celular hasta el ensayo con los fármacos.

2.5. Procesado de muestra de cartílago

2.5.1. Extracción y cultivo de los condrocitos

El procesado de la muestra una vez llegada al laboratorio se realizó en condiciones de máxima esterilidad. Para ello se desinfectó previamente la campana de flujo con alcohol al 70% y se mantuvo la luz ultravioleta como mínimo durante una hora. Todo el instrumental usado para la disgregación celular se mantuvo estéril y precintado en todo momento.

MATERIALES:

Bisturí estéril

Tijeras estériles

Tubo de 15 ml

Pipeta pasteur

Tripsina EDTA (Sigma)

PBS (Sigma)

Solución de digestión.

Solución de cultivo 20% de suero

Solución de cultivo 10% de suero

Medio de lavado

Placa Petri

Tubo de 15 ml

Pipeta Pasteur

MÉTODO:

Procesamiento de la muestra

La fragmentación del cartílago se realizó en campana de flujo laminar, se sacó el cartílago de los tubos de transporte y se colocó en una placa petri. Se añadieron 1 ml de medio de lavado (500 ml DMEM, 500 μ l de Gentamicina, 830 μ l de Ampicilina, 7 ml de insulina, 6 μ l de DNAsal) para facilitar la disgregación de las células.

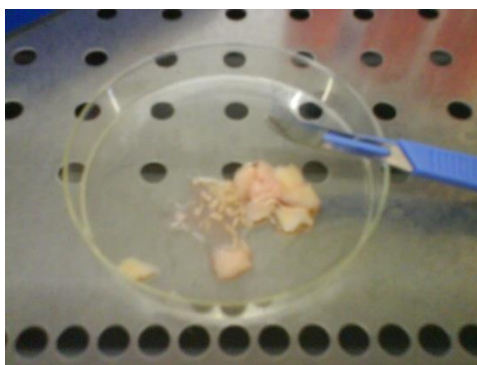


Figura 2.2. fragmentación de muestra de cartílago humano.

La muestra se cortó con la ayuda de unas tijeras y bisturí estériles (figura 2.2.), y se hicieron cortes pequeños para obtener muestras de 1 cm aproximadamente, de esta forma se ayudó a una digestión del tejido más rápida. Durante la manipulación, se dejaron caer unas gotas de Tripsina EDTA para favorecer la disgregación celular.

Tras la obtención de la muestra, se pasó a un tubo nuevo y se comenzó con dos lavados con PBS. Se invirtió varias veces el tubo y se eliminó la solución de lavado con pipeta pasteur. A continuación se le añadió 9 ml de solución de lavado.

La primera digestión se hizo con 1 ml de Tripsina EDTA durante 10 min. En el incubador a 37°C. Tras este tiempo se hicieron otros 2 lavados para eliminar la tripsina con 10 ml de solución.

Por último se añadió 10 ml de solución de digestión, (0,080 gr de colagenasa tipo IV, 500 μ l de Gentamicina, 830 μ l de Ampicilina, 2,5 μ l de DNAsa, 200 ml DMEM y se dejó la muestra en la solución durante 24 horas a 37°C con agitación. Pasadas 24 horas tras la digestión se comenzó el proceso de obtención de los condrocitos.

Se dejó el tubo en reposo durante 2 min. Para que se depositara el sedimento, a continuación se trasvasó el sobrenadante junto a las células en suspensión a un tubo nuevo, desechando los fragmentos de cartilago que no se habían digerido.

Se centrifugó el tubo 10 min. a 1700 r.p.m. y a 4°C para inactivar la colagenasa.

Tras la centrifugación se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 10 ml de solución de lavado y se volvió a centrifugar 10 min. a 1700 r.p.m. a temperatura ambiente.

Con el pellet ya limpio, se le añadió al tubo 20 ml de solución de cultivo al 20% de suero y se pasó a falcon de cultivo. Se dejó en la incubadora 24 horas.

Pasado este tiempo, se realizó el primer cambio de medio, se retiró el medio de cultivo al 20% de suero, se hizo un lavado con PBS y se añadió 20 ml de solución de cultivo al 10%, este es el medio que se usó durante todo el proceso de cultivo.

2.6 Viabilidad celular

Para asegurarnos de que las técnicas de extracción de los condrocitos habían sido las correctas y por lo tanto estábamos cultivando condrocitos humanos viables para nuestro ensayo, realizamos una tinción con azul de toluidina.

Con el microscopio óptico, el condrocito presenta un color parcialmente translúcido. El colorante azul de toluidina marca solo el colágeno que forma parte de la estructura de los condrocitos. El colágeno es afín a este colorante, tiñendo de un azul vivo a las células. (Junquera 1996, Stevens 2006)

MATERIALES:

Azul de toluidina

PBS

Paraformaldehido 4%

Tritón

METODO:

Para realizar la tinción de azul de toluidina, se fijaron previamente las células de la siguiente manera. Primero se realizaron unos lavados con PBS para eliminar las células muertas. A continuación, se cubrieron las células, con paraformaldehído al 4% durante 20 min. a temperatura de 4°C.

Pasado este tiempo, se añadió Tritón durante 25 min. a temperatura ambiente. De esta forma, con la muestra fijada, se procedió a la tinción añadiendo el azul de toluidina durante un minuto y lavando suavemente el exceso de colorante. Tras este paso se observó al microscopio.

RESULTADOS:

Una vez procesadas las muestras con azul de toluidina, se observaron las células teñidas al microscopio óptico.

Se pudo observar que los condrocitos habían quedado marcados con un intenso color azul, de esta forma pudimos constatar que las células aisladas del cartílago de nuestros pacientes eran condrocitos humanos viables para nuestro ensayo (Figura 2.3.).

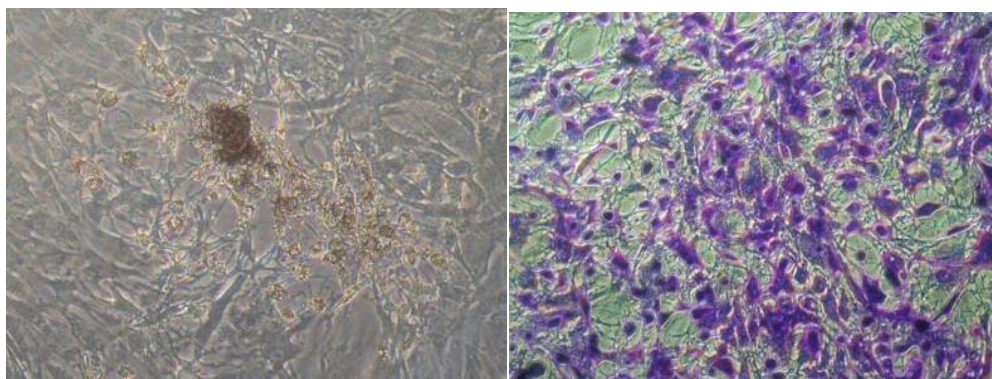


Figura 2.3., tinción de condrocitos humanos con azul de toluidina. Se observa como en la primera imagen los condrocitos no están teñidos y posee un color translucido, en la imagen siguiente se observan teñidos y de un intenso color azul violáceo.

Tras haber demostrado que trabajábamos con condrocitos humanos viables y sanos, pasamos a realizar los grupos experimentales para nuestro ensayo.

2.7. Grupos experimentales

Para el estudio, los cultivos de condrocitos, se expusieron durante diferentes tiempos (15 min/30 in/60 min) a los fármacos en estudio: bupivacaína al 0,5% y levobupivacaína al 0,5%. Como control, se usó solución salina al 0,9%.

Una vez cultivados durante 2 semanas, con medio completo y realizando los pases necesarios se obtuvieron un numero apto para comenzar el ensayo, en concreto dos millones de células por paciente.

Primero, las células en cultivo se despegaron de los frascos de cultivo y fueron sembradas en placas de 24 pocillos cultivando un número no superior a 100.000 células por ml de medio. En cada uno de los pocillos citados. Para facilitar la adaptación de las células a la nueva placa de cultivo, se mantuvieron durante dos días facilitando la adhesión de todas las células.

Veinticuatro horas antes del tratamiento experimental, las muestras de condrocitos fueron visualizadas bajo microscopio invertido, para verificar la morfología celular compatible con condrocitos diferenciados y viables.

Para comenzar el ensayo se retiró el medio de cultivo de todos los pocillos y se realizó un lavado con salino de cada uno de ellos para retirar posibles células muertas.

Tras este paso, se sometió a cada pocillo a la concentración de medicamento señalada según el protocolo: 2 ml de salino 0.9%, 2 ml de bupivacaina 0.5% y 2 ml de levobupivacaina 0.5% por pocillo.

Salino	Bupivacaina	Levobupivacaina
15 min.	15 min.	15 min.
30 min.	30 min.	30 min.
60 min.	60 min.	60 min.

Tabla 2.1.. Tiempo de exposición al fármaco.

El tiempo de permanencia del medicamento en cada pocillo se divide en tres grupos. Un primer grupo mantuvo el salino y los medicamentos a estudio durante 15 min. Otro grupo lo mantuvo durante 30 min. Y uno tercero durante 60 min. De este modo pudimos verificar si el tiempo de permanencia de la bupivacina y la levobupivacaina en el cultivo, tenía relación con la intensidad de la condrotoxicidad.

Transcurridos estos tiempos, en cada muestra se realizaron 2 lavados con salino para retirar el medicamento y se añadió de nuevo medio completo para condrocitos.

Se mantuvieron a 37° y 5% de CO₂ durante 24 horas, hasta el análisis de muerte celular.

2.8. Pruebas de viabilidad celular

Para comprobar la viabilidad celular tras la aportación de los fármacos, se realizaron diferentes pruebas celulares, para estimar el % celular perdido según los tiempos de exposición de cada anestésico. Estas mediciones se realizaron a las 24 horas, tras la exposición a los medicamentos en estudio

2.8.1. Análisis mediante microscopía invertida

El análisis por microscopía invertida se realizó solo para verificar de forma visual si las células en cultivo eran viables

Tras las 24 horas de cultivo, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se realizaron 3 lavados para eliminar el medio.

Para despegar las células de los pocillos, se les añadió 0.5 ml de tripsina y se mantuvo durante 5 minutos a 37° para favorecer la acción. Una vez despegadas las células, pasaron a tubos independientes y rotulados según el medicamento y el tiempo de administración.

A continuación, se realizó un lavado con medio de cultivo para eliminar la tripsina y el pellet obtenido tras la centrifugación se resuspendió en 1 ml de salino.

Se colocó una pequeña muestra sobre un portaobjetos y se visualizó en microscopio invertido para valorar si había cambios en las células tras el periodo del ensayo.

2.8.2. Contaje celular con cámara de Neubauer.

El contaje celular es una técnica microscópica, que nos aporta un valor cuantitativo del número de células vivas por contaje celular. Este número de células supervivientes, nos ayuda a estimar en total, el número de células por pocillo que han sobrevivido a la dosis correspondiente de anestésico.

Para el contaje con cámara de Neubauer se recogió una muestra de 50 microlitros de muestra y se le añadió 50 microlitros de azul tripan (Proporción 1:1). De esta forma, las células muertas quedaron teñidas de azul y las que habían sobrevivido, permanecían incoloras.

Por medio de una cámara de Neubauer, se realizó el contaje celular y se estimó el número de células supervivientes (no coloreadas) usando la siguiente fórmula:

n° de células / 4 cuadrantes = n° de células por cuadrante

n° de células por cuadrante $\times 2 \times 10^4 = n^{\circ}$ de células por ml

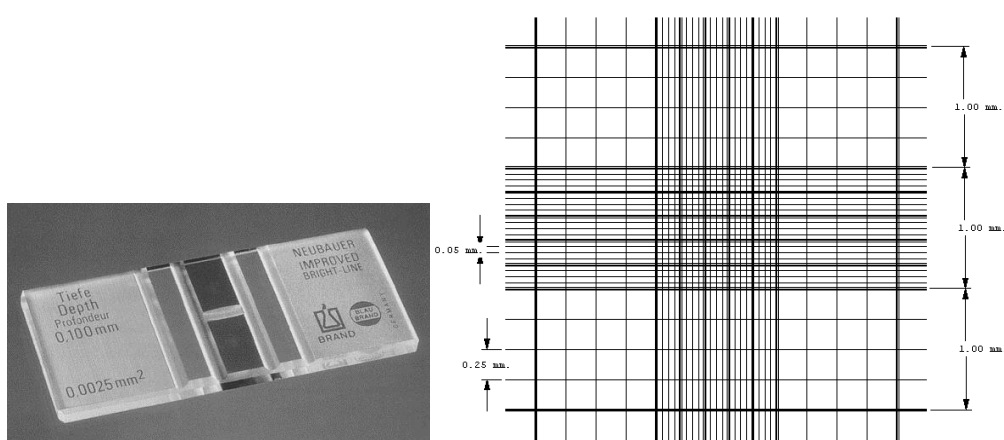


Figura 2.4. Cámara de contaje celular Neubauer

2.8.3. Citometría de Flujo.

La citometría de flujo, ayudó a conocer cuál fue la muerte celular producida por el fármaco, estimando de esta forma un valor cuantitativo en % de células vivas y células muertas, por muestra analizada. Para ello se usó un kit comercial LIFE/DEAD el cual utiliza yoduro de propidio para el marcaje celular.

El yoduro de propidio, es el colorante utilizado con mayor frecuencia para determinaciones de contenido de ADN por citometría de flujo, porque su excitación se lleva a cabo con líneas de láser de luz azul (las más comunes en los citómetros de flujo). De esta forma, en las células que permanezcan muertas, no penetra el yoduro en su ADN y no se reflejan en las concentraciones totales de cada muestra, dando un número estimado de células vivas por muestra, comparable con el número conocido, de células iniciales.

Las muestras de células despegadas se sometieron al marcaje con yoduro de propidio, para ello se realizó un lavado a 4° C 1500 rpm durante 7 min.

Tras el lavado, se resuspendieron las células en 1 microlitro de yoduro de propidio y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad para evitar la degradación del yoduro.

La concentración del yoduro fue la siguiente:

El yoduro de propidio viene en un vial de 100 microlitros a una concentración de 1 mg por ml, por lo que nosotros lo prepararemos a concentración 1:10. Usamos para ello 1 microlitro de yoduro con 9 microlitros de PBS salino. De esta mezcla se usaron 1 microlitro por muestra a analizar.

Pasado el tiempo de incubación se lavó con 1 ml PBS salino, a 4°C 1500 rpm 7 min.

Y tras este último paso se resuspendió en 500 microlitros de PBS para, seguidamente, ser medido en el citómetro de flujo.

2.9. Análisis estadístico.

Análisis descriptivo:

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de las principales variables, para ello en el caso de las variables cualitativas se obtuvo para cada una de las variables su distribución de frecuencias (número de casos y porcentaje) y se presentó como gráficos el diagrama de barras y/o el diagrama de sectores. Para el caso de las variables cuantitativas se obtuvo para cada una de esas variables: mínimo, máximo, media, mediana y desviación típica para hacer su estudio descriptivo y como gráficas se presentó el histograma y la caja con bigotes.

Basándonos en las tablas descriptivas anteriores y en las gráficas pudimos hacer una estadística descriptiva de las variables del estudio.

Análisis bivariante:

Para las variables cuantitativas se realizó un ANOVA y test de bonferroni para ver las diferencias 2 a 2. Para variables cualitativas (tipo de tratamiento o fármaco: 1, 2, 3 con muerte (Si/No) se utilizaron los test no paramétricos correspondientes.

A continuación se realizó un Modelo lineal general para medidas repetidas tomando en cuenta como factor inter-sujetos el tiempo y entre-sujetos el tratamiento o tipo de fármaco (ANOVA de medidas repetidas)

Para todos los análisis se consideraron significativo un valor $\alpha=0.05$. Los cálculos se realizaron mediante un programa estadístico.

3. Resultados.

Hemos llevado a cabo este estudio con participantes seleccionados y distribuidos en tres grupos (grupo 1: Salino; grupo 2: bupivacaína; grupo 3: Levobupivacaina) y en diferentes tiempos de exposición a los fármacos (15 minutos, 30 minutos y 60 minutos). Según la metodología expuesta en el capítulo anterior se han obtenido los siguientes resultados.

3.1. Pacientes incluidos.

Las muestras de cartílago fueron recogidas de 5 pacientes diferentes, no habiendo excluido ninguna de las muestras obtenidas.

Las muestras de los pacientes estudiados fueron de mujeres y varones, con edad comprendida entre los 70 y 80 años sometidos a prótesis total de rodilla o cadera. Todos los pacientes cumplían los criterios de inclusión respecto a la edad, peso, talla y estado físico.

3.2. Resultados de las técnicas analíticas.

3.2.1. Citometría de flujo

El kit comercial LIVE/DEAD para viabilidad celular para el análisis por citometría de flujo dio el siguiente resultado:

El efecto de los anestésicos estudiados en cada punto de tiempo se resume en la tabla 3.1 y figura 3.1.

Tiempo/anestésico	15 minutos	30 minutos	60 minutos
Salino (control)	7.12 ± 5.73	7.72 ± 5.83	9.56 ± 5.40
bupivacaina	8.04 ± 5.42 (N.S.)	8.92 ± 4.57 (N.S.)	20.72 ± 10.43 (p=0,06)
levobupivacaina	8.20 ± 5.97 (N.S.)	10.02 ± 4.51 (N.S.)	25.88 ± 14.14 (p=0,04)

Tabla 3.1: Efecto de los anestésicos con relación a la muerte celular mediante la viabilidad celular. El número medio de células muertas se indica en %. Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana (rango). Las comparaciones están relacionadas con el control en el mismo período de tiempo (columna). N.S.: no significativo.

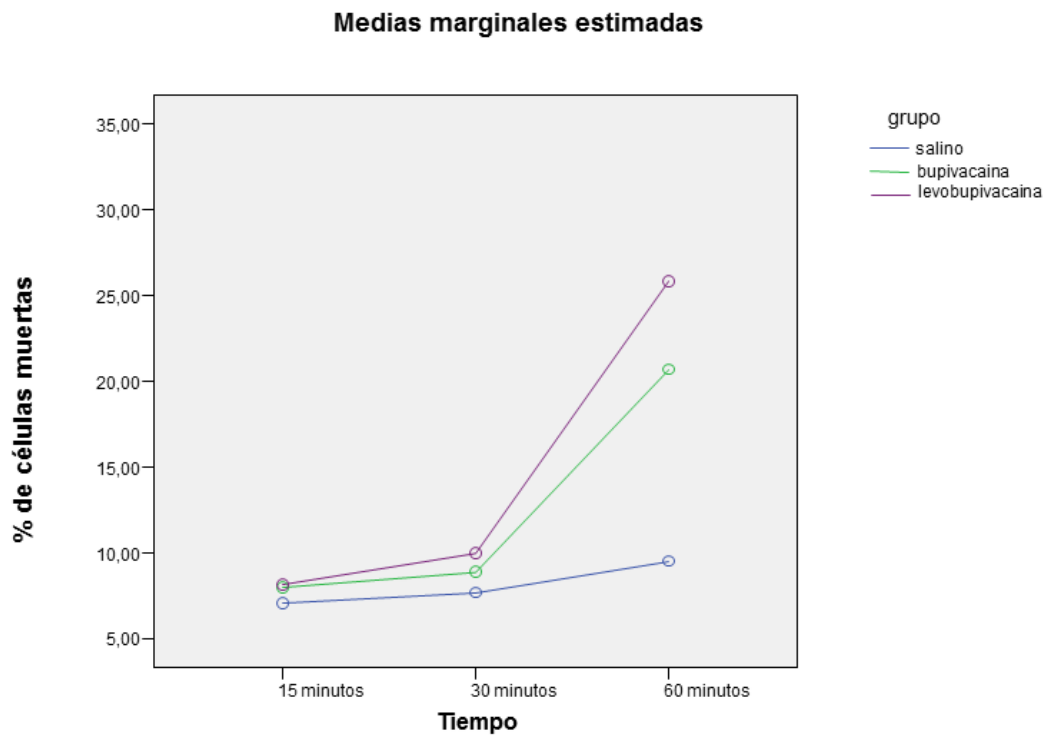


Figura 3.1.: Resultados del análisis de citometría de flujo basado en la viabilidad de las células vivas/muertas. Cada punto representa la media del número de células muertas de las muestras de los 5 pacientes estudiados, en comparación con el tiempo de exposición del cultivo celular para cada anestésico ensayado. Ver datos en la tabla 3.1.

Tiempo/ Anestésico	15 minutos	30 minutos	60 minutos	Tendencia
Salino (control)	7.12 ± 5.73	7.72 ± 5.83	9.56 ± 5.40	Mayor exposición, mayor muerte celular
bupivacaina	8.04 ± 5.42	8.92 ± 4.57	20.72 ± 10.43	Mayor exposición, mayor muerte celular
levobupivacaina	8.20 ± 5.97	10.02 ± 4.51	25.88 ± 14.14	Mayor exposición, mayor muerte celular

Tabla 3.2.: resultados estadísticos de la citometría de flujo ensayada en los cultivos celulares. Se observa que a mayor exposición al fármaco, el número de células muertas aumenta de forma exponencial.

3.2.2. Contaje en cámara de Neubauer

El uso de la cámara de Neubauer con tinción azul tripan dio los siguientes resultados:

Los resultados de viabilidad (células vivas) se expresan en la tabla 3.3. El efecto del tiempo se resume en la figura 3.3.

Ambas técnicas empleadas muestran que las células de condrocitos humanos cultivadas en monocapa y expuestas a 0,5% de bupivacaína y 0,5% levobupivacaína no revelaron ninguna alteración dependiente del tiempo en su morfología celular después de 15 minutos de exposición. Sin embargo, la exposición más larga, correspondiente a 60 minutos reveló una muerte celular significativa en comparación con el cultivo control (solución salina) con los tres anestésicos estudiados. (Figura 3.2.)

tiempo	15 vs 30 vs 60 min	Tendencia	Células vivas tras 15 min.	Células vivas tras 30 min.	Células vivas tras 60 min.
salino	p>0,05	Sin variación	92.88%*	92.28%*	90.44%*
bupivacaina	p=0.022	Mayor exposición, mayor muerte celular	91.96%*	91.08%*	79.28%*
levobupivacaina	p=0.015	Mayor exposición, mayor muerte celular	91.8%*	89.98%*	74.12%*

Tabla 3.3 se observan los resultados del ensayo de exclusión usando azul tripan como tinción y conteo en la cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se reduce tras la exposición a los fármacos, coincidiendo estos resultados con los obtenidos en la citometría de flujo. (*% De células vivas.)

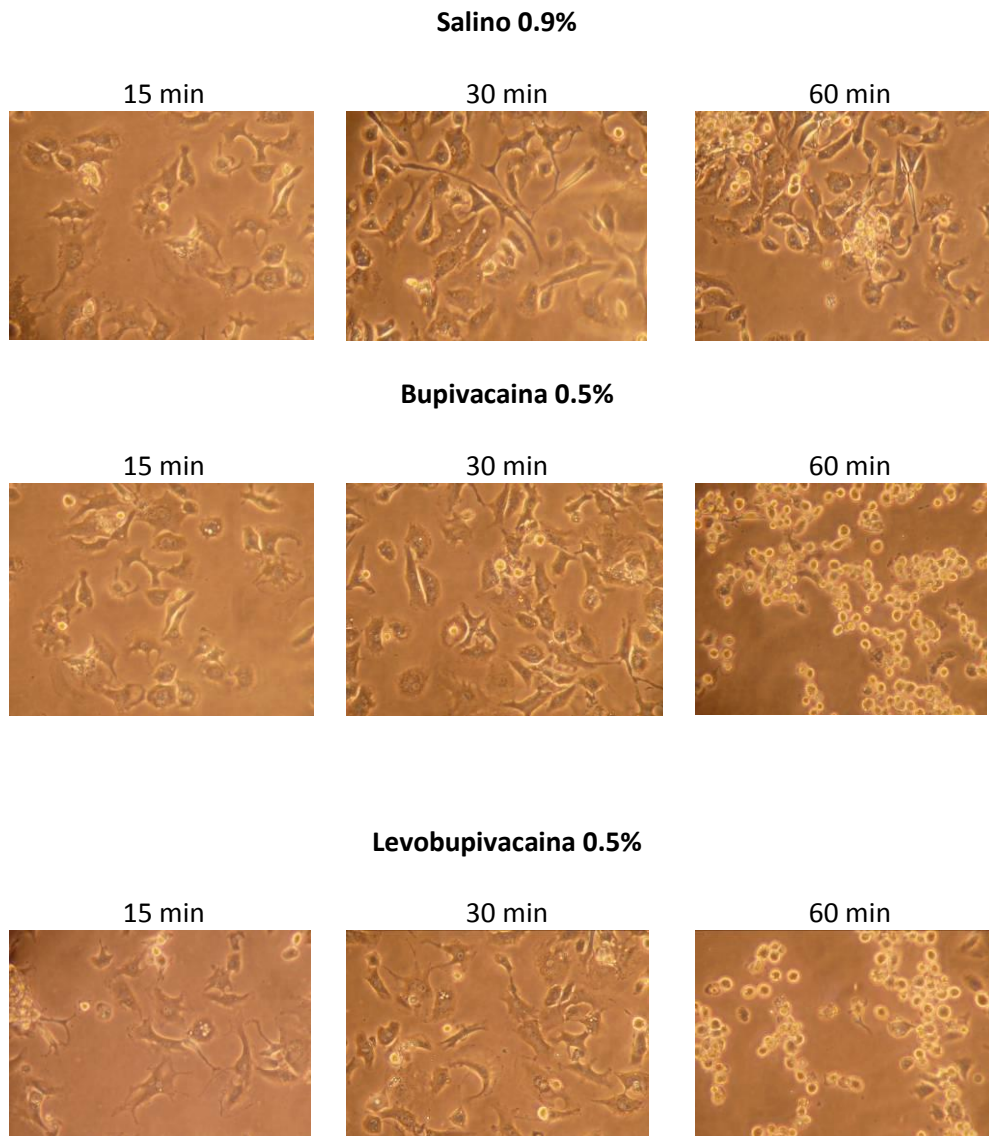


Figura 3.2: El tiempo de exposición al fármaco y la citotoxicidad de los anestésicos estudiados vienen relacionados con la muerte de las células cultivadas en monocapa. Las imágenes microscópicas de las células expuestas a 0,5% de bupivacaína, levobupivacaína y solución salina 0,9% (control), muestran, en diferentes puntos de tiempo, diferencias morfológicas claras. Las imágenes revelan que entre 15 y 30 minutos de exposición hay un bajo porcentaje de muerte celular tanto para bupivacaina como para levobupivacaina, mientras que a los 60 minutos el porcentaje de muerte celular es mayor. Por otra parte, la muerte celular es mucho más alta a 60 minutos en aquellas células expuestas a levobupivacaina frente a las expuestas a bupivacaina.

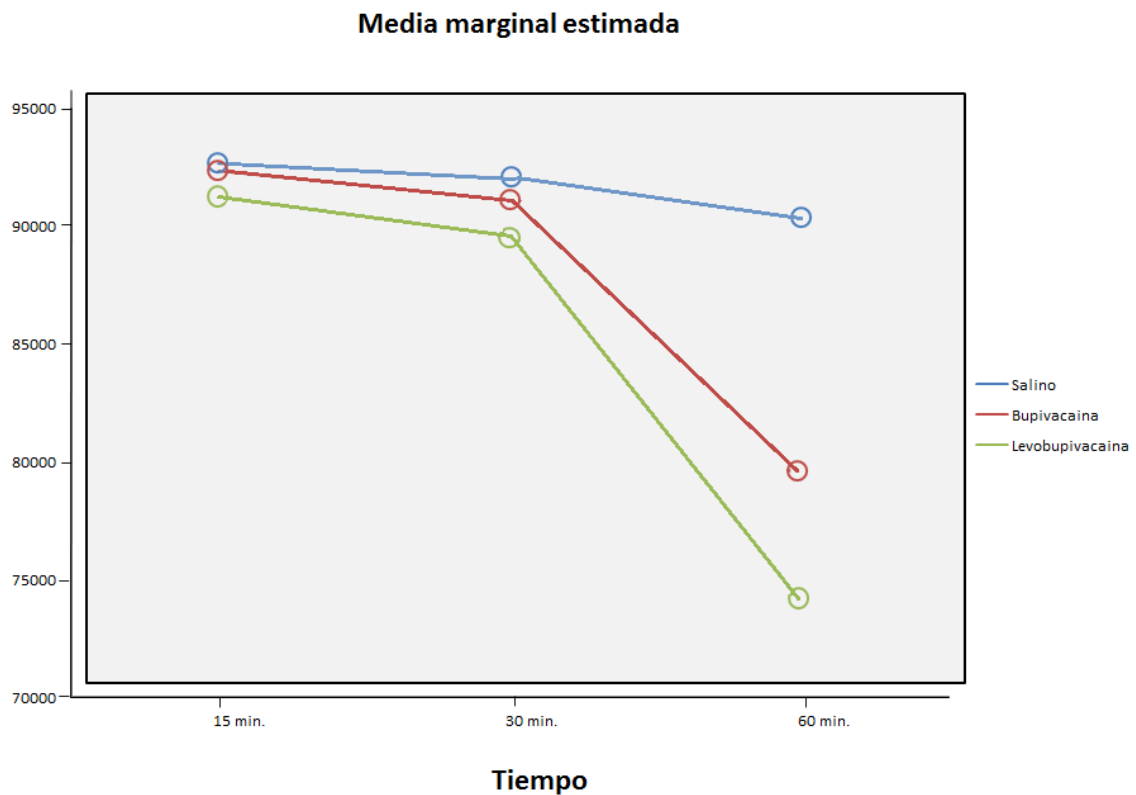


Figura 3.3: Resultados del ensayo con azul tripan. Cada punto representa la media del número de células vivas de los 5 pacientes estudiados en comparación con el tiempo de exposición a cada anestésico. Ver datos relacionados en la tabla 3.3.

4. Discusión.

Este estudio muestra que la levobupivacaína es más tóxica en contacto con células de condrocitos humanos que la solución salina a dosis clínicas habituales, siempre que la exposición a dicho fármaco sea mayor de 60 minutos. Este efecto no es tan evidente a 15 y 30 minutos de exposición.

El sistema usado en este estudio para evaluar la viabilidad del cartílago ha sido validado con estudios previos de tinción con azul de toluidina para confirmar que las muestras utilizadas en este ensayo eran condrocitos humanos sanos y aptos para nuestro estudio. Este

es un procedimiento utilizado comúnmente a la hora de realizar ensayos sobre cultivos celulares *in vitro*. Para evaluar la supervivencia de las células del cartílago, por medio de citometría de flujo y contaje celular con tinción azul tripán se utilizaron células en cultivo. Los modernos citómetros de flujo son capaces de analizar varios miles de partículas por segundo, a "tiempo real" y se pueden separar de forma activa y aislar partículas que tienen propiedades especificadas. Un citómetro de flujo es similar a un microscopio, excepto que, en lugar de producir una imagen de la célula, la citometría de flujo ofrece una cuantificación automatizada según los parámetros establecidos para un gran número de células en estudio. El recuento celular y la determinación de la viabilidad celular se llevaron a cabo mediante el uso de una cámara de Neubauer. El número de células vivas se determinó por la técnica de exclusión de las células no vitales teñidas con solución de azul de tripan, tal como se recomienda por Freshney et al . El ensayo de exclusión con azul de tripan se basa en el principio de que las células vivas no se tiñen por este medio de contraste, mientras que las células muertas no son capaces de eliminar el colorante debido a la estructura de la membrana plasmática y, por tanto, se tiñeron de color azul.

El efecto condrotóxico que posee la levobupivacaína ha sido un tanto controvertido en la bibliografía consultada. Baker et al. en un estudio *in vitro*, usó levobupivacaína comparada con solución salina sobre cultivos de condrocitos humanos durante 15 minutos utilizando diferentes dosis del fármaco y encontró un efecto tóxico dependiente de la dosis de levobupivacaína transcurridos 48 horas tras el tratamiento . Es de destacar que no se encontró diferencia entre la levobupivacaína y la solución salina cuando se usó la dosis más baja del estudio (0,13 % levobupivacaína), pero si hubo un efecto condrotóxico en dosis más altas (0,25 % y 0,5 %) . En nuestro estudio, no se encontraron diferencias en toxicidad entre la solución salina y la levobupivacaína cuando se utilizó la dosis más alta (0,5 %) durante 15 minutos. El hecho de que el artículo de Baker et al. evalúa la viabilidad de los condrocitos a las 48 horas podría haber introducido un dato extra que no se encuentra en nuestro estudio.

La levobupivacaína como anestésico ha sido comparada con bupivacaína en nuestro ensayo y se encontró una tendencia que indica que, la levobupivacaína es más tóxica que la bupivacaína (Figura 3.1.) . Baker et al . en un estudio *in vitro* con ambos fármacos (bupivacaína y levobupivacaína) aplicados a cultivos de condrocitos humanos durante 15 minutos a diferentes dosis, encontraron una viabilidad celular similar entre ambos fármacos , aunque la tendencia esperada sería que existiera menor viabilidad en el grupo levobupivacina . Este dato está de acuerdo con nuestros resultados, indicando de este modo, que la levobupivacaína tiende a ser más condrotóxica que la bupivacaína, como queríamos demostrar.

El efecto de la duración de los fármacos, en relación con la exposición sobre la viabilidad celular, se marca claramente en nuestro estudio y en muchos artículos consultados en bibliografía. Nuestros resultados son similares a los descritos por Lee et al . en un estudio realizado en cultivos de condrocitos de conejo donde se estudiaba la toxicidad producida por la bupivacaína. Este autor llega a la conclusión de que la bupivacaína es toxica dependiendo del tiempo de exposición. Lee et al. cree que se produce una necrosis en el lugar donde se origina la muerte celular. Chu et al . llega a la misma conclusión en su artículo donde realizó similares estudios sobre condrocitos humanos y bovinos . Sin embargo, la tasa de muerte obtenida es mucho mayor : > 95 % de muerte celular después de mantener en contacto la bupivacaína 0,5% durante 30 min en los cultivos .

Sin embargo, no todos los estudios revisados indican una relación entre el tiempo y la muerte celular. Gomoll et al. en un experimento *in vivo* sobre animales de experimentación (modelo de conejo) donde se sometieron a dosis de bupivacaína 0,5 % con y sin epinefrina sobre articulaciones de hombro durante un periodo continuo de 48 horas. No se detectó, en los resultados obtenidos, ningún deterioro permanente de la función del cartílago tras 3 meses después de haber administrado la dosis intra-articular. Es posible que la solución se diluyera *in vivo* y las concentraciones reales no se alcanzaron en las células vivas. Esto nos dio la idea de avanzar un poco más en este estudio y realizar el ensayo de bupivacaina sobre cartílago humano *in vivo*.

El valor de pH se controló a cada momento durante el estudio. Bogatch et al. en un artículo sobre cultivos de condrocitos bovinos encontraron menor muerte celular : alrededor del 13 % transcurrido 60 minutos tras la administración de bupivacaína. Bogatch et al. piensan que la condrotoxicidad pudo ser debida a la acidez. Por ello, en nuestro estudio, el pH fue controlado a 5,5, consiguiendo de este modo que no se encontrara ninguna diferencia significativa en la muerte celular causada por valores de pH.

La posible limitación de este estudio es que se trata de un estudio *in vitro*, una condición no equivalente a haber realizado el estudio *in vivo*, donde la matriz del cartílago puede proteger los condrocitos. Por otra parte, la permanencia del fármaco en la articulación *in vivo* es desconocida si no se introduce ningún sistema de lavado (como pueda ocurrir durante una artroscopia), por lo que el momento exacto en que el fármaco está actuando en una concentración determinada es desconocido.

Nuestro objetivo era simular la configuración habitual que se produce durante la clínica, donde se da una sola dosis postoperatoria de anestesia. Otros estudios (Chu , 2008 ; Chu, 2006) utilizan un medio de cultivo continuo con diferentes anestésicos durante la exposición de los fármacos que van a estudiar. En nuestro estudio, hemos mantenido en contacto las células con los fármacos en un periodo de tiempo (15, 30 y 60 minutos) trascurrido este, se hicieron varios lavados para eliminar los restos.

Para estudiar los efectos de estos anestésicos en tratamiento prolongado, sería necesario mezclar los anestésicos con medio de cultivo normal que se usan para el cultivo, esto ocasionaría la continua toxicidad y por tanto las células morirían a causa de la privación de nutrientes. El efecto de esta privación de nutrientes se ve en el grupo control (solución salina), que provocó la muerte por estrés celular, pero a un grado mucho menor que los grupos expuestos a las drogas (Figura 3.1) .

5. Conclusiones

En conclusión, este estudio demuestra que la exposición a levobupivacaina en dosis clínicas en una sola toma más de 60 minutos es tóxica para cultivos de condrocitos articulares humanos. La bupivacaína, por lo contrario, parece ser menos tóxica que la levobupivacaína. Por consiguiente en el ámbito clínico, no se recomienda el uso de levobupivacaina para controlar el dolor después de una cirugía articular, si se presume una exposición sobre el cartílago articular de más de 30 minutos.

**2ª parte: EFECTO DE LA ROPIVACAINA *IN VITO*
SOBRE CONDROCITOS DE CARTÍLAGO
ARTICULAR HUMANO.**

2ª parte: EFECTO DE LA ROPIVACAÍNA *IN VITO* SOBRE CONDROCITOS DE CARTÍLAGO ARTICULAR HUMANO.

Hipótesis:

- 1.- La ropivacaína es menos tóxica que la bupivacaina para los condrocitos humanos.
- 2.- La citotoxicidad de la bupivacaína y ropivacaina, es dependiente del tiempo de exposición al fármaco.

Objetivos:

- 1.- Valorar y comparar la capacidad toxicocondrocítica, de los anestésicos bupivacaina y ropivacaina a concentración de 0,5%, en cultivos *in vitro*.
- 2.- Valorar la toxicidad de los mismos según el tiempo de exposición: 15 min/30 min/ 60 min

2. Materiales y métodos.

2.1 Diseño del estudio.

El siguiente estudio se realizó utilizando las mismas muestras de los pacientes que se emplearon para el estudio comparativo entre bupivacaina y levobupivacaina. De este modo se utilizaron las muestras del consentimiento del Comité de Ética del Complejo Hospitalario de Jaén y del Comité de ética de la Universidad de Jaén ANEXO I. ANEXO II

A los pacientes antes de la realización de la técnica anestésica se les explicó la técnica y dieron su consentimiento para el uso de muestras biológicas para el ensayo. El presente estudio es observacional, de una cohorte de diez pacientes, dentro del contexto de una intervención clínica rutinaria de pacientes sometidos a una técnica de anestesia e intervenidos de prótesis de rodilla. ANEXO III.

2.2. Reclutamiento de pacientes

2.2.1. Protocolo del estudio

Los pacientes reclutados para el estudio cumplían los mismos criterios de inclusión que en el ensayo realizado anteriormente con levobupivacaina.

- Artritis reumatoidea.
- Artritis traumática.
- Otras artropatías no sépticas.

Los sujetos candidatos a participar en el estudio cumplieron todos los siguientes *criterios de inclusión*:

- Pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 50 y 80 años.
- Pacientes que fueron sometidos a intervención quirúrgica de prótesis de rodilla.

No se incluyeron en el estudio ningún sujeto que presentara alguno de los siguientes *criterios de exclusión*:

- Pacientes con alergia a algunos de los anestésicos locales empleados.
- Paciente con infección.

-
- Paciente que expresase su negativa a realizar el estudio.
 - Pacientes que no cumplían alguno de los criterios de inclusión

2.2.2. Fármacos utilizados.

Los fármacos de estudio utilizados en nuestro estudio clínico fueron los siguientes:

- Ropivacaína (Naropin Poliamp) 0,5% (10 ml). Lab. AstraZeneca
- Bupivacaína (Inibsacain) al 0,5% (10 ml). Lab. Inibsa

2.3. Recogida de muestra de cartílago.

Se usaron para este estudio, condrocitos humanos obtenidos de tejido cartilaginoso sano. Para ello usaron las mismas muestras de los 10 pacientes que se usaron para el ensayo con levobupivacaina y bupivacaina. Como ya se comentó fueron sometidos a intervenciones quirúrgicas de reemplazo total de rodilla, en el servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología (COT) del Complejo Hospitalario de Jaén (CHJ), previo consentimiento informado. Las muestras recogidas en quirófano, se transportaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium al 1% de antibióticos, y se mantuvieron a 4º hasta su procesado en los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén.

2.4. Preparado de medios de cultivo

Las muestras empleadas fueron cultivadas en medio DMEM Completo tras su aislamiento como se describió en el apartado anterior.

2.4.1 Procesado de muestra de cartílago

El procesado fue el mismo que el descrito en el apartado anterior y para este ensayo se mantuvieron las células en medio de cultivo DMEM completo hasta obtener un número adecuado de células que nos permitieran realizar el estudio.

2.5. Grupos experimentales

Para el estudio de ropivacaina y bupivacaina en cultivos *in vivo*, las células, se expusieron durante diferentes tiempos (15 min /30 min/ 60 min) a los fármacos en estudio: bupivacaína al 0,5% y ropivacaína al 0,5%. Como control, se usó solución salina al 0,9%.

El proceso de cultivo que se realizó fue el mismo que el usado en el ensayo de levobupivacaina y bupivacaina citados en el bloque anterior.

Una vez cultivados durante 2 semanas, con medio completo y realizando los pases necesario se obtuvieron un numero apto para comenzar el ensayo, en concreto dos millones de células por muestra de paciente.

Primero, las células en cultivo se despegaron de los frascos de cultivo y fueron resembradas en placas de 24 pocillos cultivando un número no superior a 100.000 células por ml de medio.

Veinticuatro horas antes del tratamiento experimental, las muestras de condrocitos fueron visualizadas bajo microscopio invertido, para verificar la morfología celular compatible con condrocitos diferenciados y viables.

Para comenzar el ensayo se retiró el medio de cultivo de todos los pocillos y se realizó un lavado con salino de cada uno de ellos para retirar posibles células muertas.

Tras este paso, se sometió a cada pocillo a la concentración de medicamento señalada según el protocolo: 2 ml de salino 0.9%, 2 ml de bupivacaina 0.5% y 2 ml de ropivacaina 0.5% por pocillo.

Salino	Bupivacaina	Ropivacaina
15 min.	15 min.	15 min.
30 min.	30 min.	30 min.
60 min.	60 min.	60 min.

Tabla 2.1. Tiempo de exposición al fármaco.

El tiempo de permanencia del medicamento en cada pocillo se divide en tres grupos. Un primer grupo mantuvo el salino y los medicamentos durante 15 min. Otro grupo lo mantuvo durante 30 min. Y uno tercero durante 60 min. De este modo pudimos verificar si el tiempo de permanencia de la bupivacina y la ropivacaina en el cultivo, tenía relación con la intensidad de la condrotoxicidad.

Transcurridos estos tiempos, en cada muestra se realizaron 2 lavados con salino para retirar el medicamento y se añadió de nuevo medio completo para condrocitos.

Se mantuvieron a 37° y 5% de CO₂ durante 24 horas, hasta el análisis de muerte celular.

2.6 Pruebas de viabilidad celular

Para comprobar la viabilidad celular tras la exposición de los fármacos, se realizaron diferentes pruebas de viabilidad celular, para estimar el % celular perdido según los tiempos de exposición de cada anestésico. Estas mediciones se realizaron a las 24 horas, tras la exposición a los medicamentos en estudio. Al igual que en ensayo con levobupivacaina, se usaron las técnicas de análisis mediante microscopía invertida, conteo celular con cámara de Neubauer y citometría de flujo.

2.6.1. Análisis mediante microscopía invertida

El uso de microscopía invertida sirvió solo para verificar de forma visual si las células en cultivo eran viables

Tras las 24 horas de cultivo, se retiró el medio de cultivo de los pocillos, se les añadió 0.5 ml de tripsina y se mantuvo durante 5 minutos a 37° para favorecer la acción de la tripsina pasando posteriormente las muestras a tubos independientes y rotulados según el medicamento y el tiempo de administración.

Se colocó una pequeña muestra sobre un portaobjetos y se visualizó en microscopio invertido para valorar si había cambios en las células tras el periodo del ensayo.

2.6.2. Contaje celular con cámara de Neubauer.

El contaje celular es una técnica por la cual, por medio de microscopía óptica se obtiene un valor cuantitativo del número de células vivas por contaje celular. Este número de células vivas, nos ayuda a estimar el número total de células por pocillo que han sobrevivido a la dosis correspondiente de anestésico.

Para el contaje con cámara de Neubauer se recogió una muestra de 50 microlitros de muestra y se le añadió 50 microlitros de azul tripan (Proporción 1:1). De esta forma, las células muertas quedaron teñidas de azul y las que habían sobrevivido, permanecían incoloras.

Por medio de una cámara de Neubauer, se realizó el contaje celular y se estimó el número de células supervivientes (no coloreadas).

2.6.3. Citometría de Flujo.

La técnica de citometría de flujo, ayudó a conocer cuál fue la muerte celular producida por el fármaco, estimando de esta forma un valor cuantitativo en % de células vivas y células muertas, por muestra analizada. Para ello se usó un kit comercial LIFE/DEAD el cual utiliza yoduro de propidio para el marcaje celular.

El yoduro de propidio, es el colorante utilizado con mayor frecuencia para determinaciones de contenido de ADN por citometría de flujo, porque su excitación se lleva a cabo con líneas de láser de luz azul (las más comunes en los citómetros de flujo). De esta forma, en las células que permanezcan muertas, no penetra el yoduro en su ADN y no se reflejan en las concentraciones totales de cada muestra, dando un número estimado de células vivas por muestra, comparable con el número conocido, de células iniciales.

Las muestras de células despegadas se sometieron al marcaje con yoduro de propidio, para ello se realizó un lavado a 4° C 1500 rpm durante 7 min.

Tras el lavado, se resuspendieron las células en 1 microlitro de yoduro de propidio y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad para evitar la degradación del yoduro.

La concentración de yoduro de propidio utilizada para la citometría de flujo fue la misma utilizada en el ensayo con levobupivacaina. La concentración de 1:10 (1 microlitro de yoduro con 9 microlitros de PBS salino), permitió la incubación de las muestras a analizar durante 7 minutos y posteriormente se midió en el citómetro de flujo.

2.7. Análisis estadístico.

Análisis descriptivo:

En primer lugar se realizó un análisis descriptivo de las principales variables, para ello en el caso de las variables cualitativas se obtuvo para cada una de las variables su distribución de frecuencias (número de casos y porcentaje) y se presentó como gráficos el diagrama de barras y/o el diagrama de sectores. Para el caso de las variables cuantitativas se obtuvo para cada una de esas variables: mínimo, máximo, media, mediana y desviación típica para hacer su estudio descriptivo y como gráficas se presentó el histograma y la caja con bigotes. Basándonos en las tablas descriptivas anteriores y en las gráficas pudimos hacer una estadística descriptiva de las variables del estudio.

Análisis bivariante:

Para las variables cuantitativas se realizó un ANOVA y test de bonferroni para ver las diferencias 2 a 2. Para variables cualitativas (tipo de tratamiento o fármaco: 1, 2, 3 con muerte (Si/No) se utilizaron los test no paramétricos correspondientes.

A continuación se realizó un Modelo lineal general para medidas repetidas tomando en cuenta como factor inter-sujetos el tiempo y entre-sujetos el tratamiento o tipo de fármaco (ANOVA de medidas repetidas)

Para todos los análisis se consideraron significativo un valor $\alpha=0.05$. Los cálculos se realizaron mediante un programa estadístico.

3. Resultados.

Tras haber sometido a la exposición durante 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos las células en cultivo de los participantes seleccionados. Nos dirigimos a observar los resultados de los fármacos en estudio según sus grupos. (grupo 1: Salino; grupo 2: bupivacaína; grupo 3: ropivacaína)

Según la metodología expuesta en el capítulo anterior se han obtenido los siguientes resultados.

3.1. Diseño del estudio.

Las muestras de cartílago fueron recogidas de 5 pacientes diferentes, no habiendo excluido ninguna de las muestras obtenidas.

Las muestras de los pacientes estudiados fueron de mujeres y varones, con edades comprendidas entre 70 y 80 años sometidos a prótesis total de rodilla o cadera.

3.2. Valoración de las técnicas analíticas.

3.2.1. Citometría de flujo

El kit comercial LIVE/DEAD para viabilidad celular para el análisis por citometría de flujo dio el siguiente resultado:

El efecto de los anestésicos estudiados en cada punto de tiempo se resume en la tabla 3.1 y figura 3.1.

Tiempo/anestésico	15 minutos	30 minutos	60 minutos
Salino (control)	7.12 ± 5.73	7.72 ± 5.83	9.56 ± 5.40
bupivacaína	8.04 ± 5.42 (N.S.)	8.92 ± 4.57 (N.S.)	20.72 ± 10.43 (p=0,06)
ropivacaína	9.32 ± 7.31(N.S.)	13.34 ± 11.06(N.S.)	32.28 ± 19.88(p=0,04)

Tabla 3.1: Efecto de bupivacaina y ropivacaina con relación a la muerte celular mediante la viabilidad celular. El número medio de células muertas se expresa en %. Los valores se indican como media \pm desviación estándar o mediana (rango). Las comparaciones están relacionadas con el control en el mismo período de tiempo (columna). N.S.: no significativo.

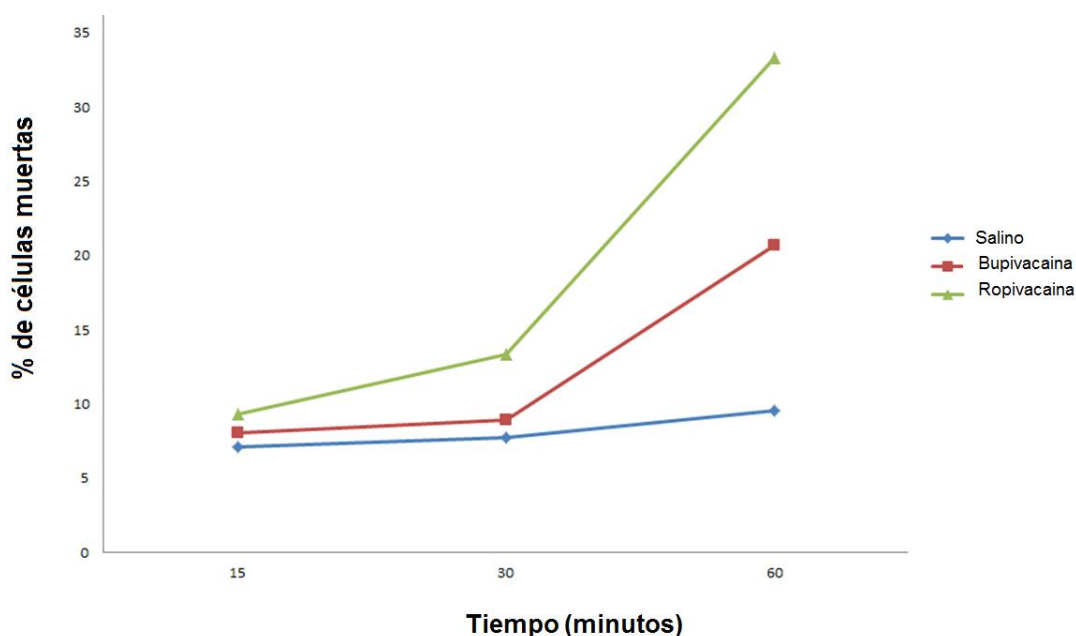


Figura 3.1.: Resultados del análisis de citometría de flujo basado en la viabilidad de las células vivas/muertas. Cada punto representa la media del número de células muertas de las muestras de los 5 pacientes estudiados, en comparación con el tiempo de exposición del cultivo celular para cada anestésico ensayado. Ver datos en la tabla 3.1.

Tiempo/ Anestésico	15 minutos	30 minutos	60 minutos	Tendencia
Salino (control)	7.12 \pm 5.73	7.72 \pm 5.83	9.56 \pm 5.40	Mayor exposición, mayor muerte celular
bupivacaina	8.04 \pm 5.42	8.92 \pm 4.57	20.72 \pm 10.43	Mayor exposición, mayor muerte celular
ropivacaina	9.32 \pm 7.31	13.34 \pm 11.06	33.28 \pm 19.88	Mayor exposición, mayor muerte celular

Tabla 3.2.: resultados estadísticos de la citometría de flujo ensayada en los cultivos celulares. Se observa que a mayor exposición al fármaco, el número de células muertas aumenta de forma exponencial.

3.2.2. Contaje en cámara de Neubauer

El uso de la cámara de Neubauer con tinción azul tripan dio los resultados de células vivas expresadas en la tabla 3.3 y la figura 3.3 con relación al tiempo de exposición a bupivacaína, ropivacaína y al control (salino).

Ambas técnicas empleadas muestran que las células de condrocitos humanos cultivadas *in vitro* y expuestas a 0,5% de bupivacaína y 0,5% ropivacaína no revelaron ninguna alteración dependiente del tiempo en su morfología celular después de 15 minutos de exposición. Sin embargo, la exposición más larga, correspondiente a 60 minutos reveló una muerte celular significativa en comparación con el cultivo control (solución salina) con los dos anestésicos estudiados y el control. (Figura 3.2.)

tiempo	15 vs 30 vs 60 min	Tendencia	Células vivas tras 15 min.	Células vivas tras 30 min.	Células vivas tras 60 min.
salino	p>0,05	Sin variación	92.88%*	92.28%*	90.44%*
bupivacaína	p=0.022	Mayor exposición, mayor muerte celular	91.96%*	91.08%*	79.28%*
ropivacaína	p=0.015	Mayor exposición, mayor muerte celular	90.68%*	86.66%*	66.72%*

Tabla 3.3 se observan los resultados del ensayo de exclusión usando azul tripan como tinción y contaje en la cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se reduce tras la exposición a los fármacos, coincidiendo estos resultados con los obtenidos en la citometría de flujo. (*% De células vivas.)

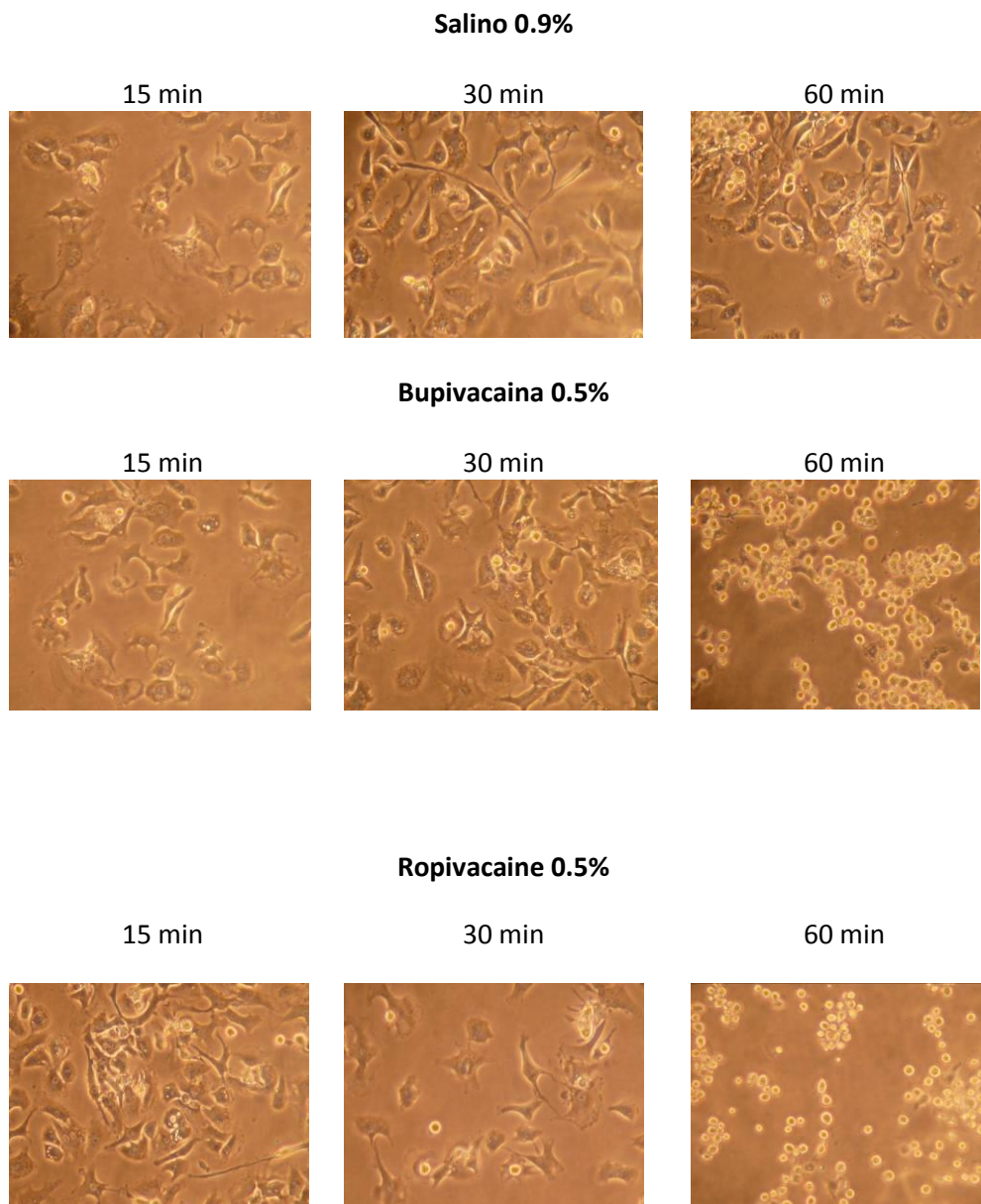


Figura 3.2: El tiempo de exposición al fármaco y la citotoxicidad de los anestésicos estudiados vienen relacionados con la muerte de las células cultivadas *in vitro*. Las imágenes microscópicas de las células expuestas a 0,5% de bupivacaína y ropivacaína y solución salina 0,9% (control), muestran, en diferentes intervalos de tiempo, diferencias morfológicas claras. Las imágenes revelan que entre 15 y 30 minutos de exposición hay un bajo porcentaje de muerte celular tanto para bupivacaina como para ropivacaina, mientras que a los 60 minutos el

porcentaje de muerte celular es mayor. Por otra parte, la muerte celular es mucho más alta a 60 minutos en aquellas células expuestas a ropivacaina frente a las expuestas a bupivacaina.

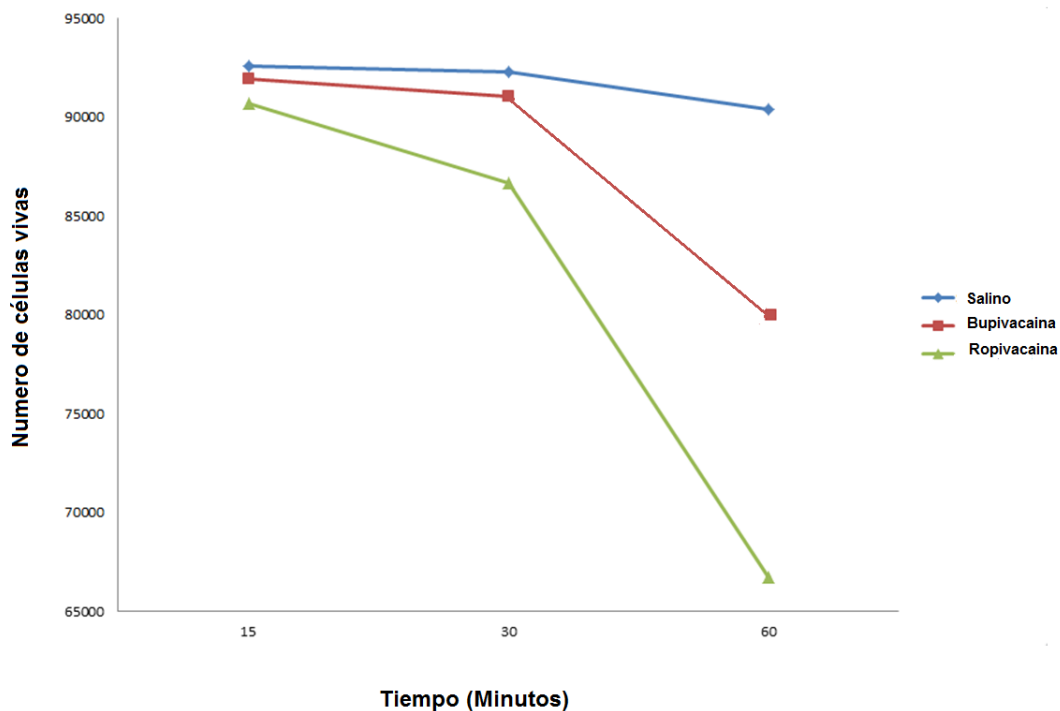


Figura 3.3: Resultados del ensayo con azul tripan. Cada punto representa la media del número de células vivas de los 5 pacientes estudiados en comparación con el tiempo de exposición a cada anestésico. Ver datos relacionados en la tabla 3.3.

4. Discusión.

Este estudio, al igual que el anterior, muestra de forma comparativa la actividad condrotóxica entre dos anestésicos, bupivacaina y ropivacaina. En este caso, el estudio demuestra que la ropivacaina es más tóxica para los condrocitos humanos cuando la exposición a más de 60 minutos, si la comparamos con la bupivacaina y el control (salino) a dosis clínicas habituales. Por otro lado, este efecto no se observa tan claro a 15 minutos de exposición de los fármacos a las células.

El efecto chondrotóxico de la ropivacaina ha sido un tema controvertido tras mirar en la bibliografía publicada ya que varios autores afirman ideas diversas. Baker et al. en un estudio

in vitro , comparó la ropivacaína con solución salina aplicando ambos compuestos por separado en cultivos de condrocitos humanos durante un tiempo de exposición determinado, en concreto durante 15 minutos. Para ello utilizó la ropivacaina a diferentes dosis encontrando un efecto condrotóxico dependiente de la dosis transcurridas 48 horas de la exposición. De esta forma, comparando las diferentes dosis que utilizó, no encontró diferencia entre la ropivacaína y la solución salina cuando se usó una dosis de 0,19 % de ropivacaína , pero si halló cambios significativos en dosis más altas (0,25 % y 0,5 %) .

Si pasamos ahora a comparar la ropivacaina con la bupivacaina, encontramos que algunos autores afirman que ambos fármacos poseen la misma toxicidad al estar en contacto con condrocitos. En otro ensayo *in vitro* también realizado por Baker et al . usando bupivacaína y ropivacaína, compararon ambos fármacos en cultivos de condrocitos humanos durante 15 minutos a diferentes dosis encontrando una viabilidad celular similar entre ambos fármacos. Aunque este dato puede sorprender, Baker et al. afirman que existe una mayor tendencia de muerte celular en el grupo ensayado con ropivacina que el ensayado en bupivacaina . Este concuerda con los datos extraídos en nuestro ensayo donde se indica que la ropivacaína tienden a ser más chondrotoxica que la bupivacaína.

Por lo contrario, en trabajos encontrados en bibliografía donde se compara la toxicidad entre bupivacaina y ropivacaina, encontramos resultados contradictorios a los nuestros. Autores como Bruce et al. afirman que, tras un ensayo con 12 pacientes, encontraron un 25% menos de toxicidad de ropivacaina frente a la bupivacaina. Lee et al. en un ensayo de toxicidad entre estos dos fármacos también afirma haber obtenido unos resultados parecidos a Bruce et al. donde obtuvo que, la ropivacaina era un 0.5% menos tóxica frente a la bupivacaina en cartílago humano cultivado *in vitro*. Frente a estos resultados contradictorios a los nuestros solo podemos afirmar que en nuestro ensayo hemos usado la comparativa en un rango de tiempo determinado, de las dosis que normalmente se usan de ropivacaina y bupivacaina en quirófano sin aumentar su volumen o concentración. En los estudios citados anteriormente se usaron

diferentes concentraciones, mucho mayores a las usadas en nuestro estudio, que podrían dar resultados diferentes.

El efecto de la exposición de las células a los fármacos ensayados y la viabilidad celular, viene bien explicada en nuestro estudio y en muchos artículos revisados en bibliografía. Nuestros resultados son muy similares a los obtenidos por Lee et al. en un estudio realizado sobre cultivos in vitro de condrocitos de conejo. Este autor llega a la conclusión de que la bupivacaína es tóxica dependiendo del tiempo de permanencia con las células. Chu et al . llega a la misma conclusión habiendo realizado ensayos de viabilidad en condrocitos humanos y bovinos dependientes del tiempo de exposición a la bupivacaina. De esta forma, coinciden con nuestros resultados y podemos afirmar que la permanencia de la bupivacaina sobre cultivos de condrocitos en periodos largos de tiempo, producen un efecto condrotóxico sobre estas células.

La limitación que posee este estudio, al igual que el anterior estudio de comparación entre levobupivacaian y bupivacaina es que todo el ensayo se ha realizado in vitro, y se desconoce los efectos que se podrían producir in vivo , donde existen estructuras anatómicas que protegen el cartílago articular.

5. Conclusiones

En conclusión, nuestro estudio ha demostrado que una larga exposición (60 minutos) a la ropivacaína usando dosis clínicas, produce un efecto tóxico para los condrocitos humanos, mientras que la bupivacaína a tiempos de exposición idénticos demuestra ser menos chondrotoxica que ropivacaína. De este modo en el ámbito clínico, no se recomendaría el uso de ropivacaína en largos periodos de permanencia del fármaco (mayores a 30 minutos) en la zona de la articulación para controlar el dolor después de una cirugía de rodilla ya que podría dañar el cartílago articular.

**3ª parte: EFECTO *IN VIVO* DE ANESTÉSICOS
LOCALES EN ARTROSCOPIA DE RODILLA.**

3ª parte: EFECTO *IN VIVO* DE ANESTÉSICOS LOCALES EN ARTROSCOPIA DE RODILLA.

Hipótesis:

1.- La concentración intraarticular de bupivacaina tras inyectar una única dosis después de una intervención de artroscopia de rodilla, disminuye progresivamente, hasta ser prácticamente cero a los 30 minutos.

Objetivos:

1.- Realizar una curva de concentración-tiempo de la bupivacaina intraarticular in vivo tras una artroscopia de rodilla.

2. Materiales y métodos.

2.1 Diseño del estudio.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les explicó el propósito del mismo y su metodología, y aceptaron a participar en el mismo. Se diseñó un estudio observacional, de una cohorte de 15 pacientes, dentro del contexto de una intervención clínica rutinaria de pacientes sometidos a una técnica de anestesia e intervenidos de prótesis de rodilla. ANEXO IV.

2.2. Reclutamiento de pacientes

2.2.1. Protocolo del estudio

Los sujetos candidatos a participar en el estudio cumplieron todos los siguientes *criterios de inclusión*:

- Pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 35 y 65 años.
- Pacientes que iban a ser sometidos a intervención quirúrgica de artroscopia de rodilla, bajo anestesia local.

No se incluyeron en el estudio ningún sujeto que presentara alguno de los siguientes *criterios de exclusión*:

- Pacientes con alergia a Bupivacaina.
- Paciente con infección.
- Paciente que expresase su negativa a realizar el estudio o no firmaran el consentimiento.
- Cualquier complicación intraoperatoria que condicione, a juicio del cirujano, un mayor sangrado postoperatorio.
- Cualquier cambio en la técnica quirúrgica respecto a lo programado (adición de perforaciones en cartílago, sinovectomía, cuerpo libre, sutura meniscal, etc).

2.2.2. Fármacos utilizados.

Los medicamentos utilizados durante la intervención clínica fueron los siguientes:

- Midazolam (0,03-0,05 mg/kg vía intravenosa).

Anestésicos locales para infiltración: una solución compuesta al 50% por:

- Mepivacaína 2% sin adrenalina y
- Bupivacaína 0,5% con adrenalina 1:200.000

Suero de lavado:

- Suero fisiológico con adrenalina 1:300:000

2.3. Intervención artroscópica.

La anestesia se realizó mediante infiltración de 5 cc de dicha solución en cada uno de los dos portales artroscópicos y 10 cc de una solución de 20 cc realizada con 10 cc de mepivacaína 2% y 10 cc de bupivacaína 0,5% con adrenalina (1:200.000). Tras 10-20 minutos se realizó la artroscopia, y durante la misma se utilizó suero fisiológico de lavado con adrenalina (1:300.000).

Una vez terminada la intervención, se extrajo todo el líquido posible de la rodilla y se introdujo en la articulación, a través de uno de los portales artroscópicos una solución de 10 ml (1 ampolla) de bupivacaína 0,5% con adrenalina (1:200.000).

Posteriormente se pidió al paciente que moviera la rodilla para difundir el líquido. Inmediatamente tras esto se realizó una punción de 1 cc de líquido para comprobar la concentración del mismo.

2.4. Recogida de muestra de líquido sinovial.

Se extrajeron para los diferentes ensayos, 1 mililitro de líquido sinovial de los pacientes recogidos a diferentes tiempos de exposición (según el grupo experimental): 15, 30 y 60 minutos.

Estas muestras se obtuvieron de 15 pacientes divididos en tres grupos de cinco pacientes cada uno, y cada grupo representaba un tiempo de exposición al fármaco determinado del siguiente modo:

- a) grupo 1: se extrajo la muestra a los 15 min
- b) grupo 2: se extrajo la muestra a los 30 min
- c) grupo 3: se extrajo la muestra a los 60 min

A cada paciente se le recogían tres muestras, una primera sin haber administrado la medicación, y que servía de control, otra muestra justo tras el momento de inyectar la dosis del fármaco, considerada tiempo 0 y una tercera muestra pasado el tiempo correspondiente al grupo que pertenecía el paciente (15,30 o 60 min).

Todo este proceso se realizó en condiciones estériles, dentro de quirófano y utilizando frascos de transporte esterilizados. De tal forma, se obtuvieron las muestras viables que fueron mantenidas a 4°C hasta su traslado a los laboratorios para realizar el análisis en los Servicios Técnicos de la Universidad de Jaén.

Este proceso de transporte no duró más de unas horas ya que la muestra no podía estar, tras la recogida, más de doce horas en frío y sin procesar. Un tiempo superior al indicado solo facilitaría el deterioro de la muestra con la consiguiente degradación del fármaco.

2.5. Procesado de las muestras

El procesado de la muestra una vez llegados al laboratorio se realizó con extremo cuidado para evitar que cualquier contaminación en la muestra alterara los resultados. Para ello se desinfectó previamente con alcohol al 70% la zona de trabajo y el instrumental que se iba a utilizar, en concreto micropipetas, vasos de precipitado y la cubeta de cuarzo perteneciente al espectrofotómetro y que debería albergar las muestras durante su análisis. Además se utilizó agua ultra pura MilliQ que no poseía ningún tipo de sales o sustratos que pudieran interactuar con las muestras dando falsos datos. Todo el instrumental usado se mantuvo estéril y precintado en todo momento.

MATERIALES:

Tubo de 15 ml

Pipeta

Puntas para pipeta

Agua ultra pura MilliQ

MÉTODO:

Dilución de la muestra

A cada una de las muestras de líquido sinovial extraídas, se les realizó una dilución previa. Esta dilución servía para obtener resultados óptimos dentro de la longitud de onda que el espectrofotómetro iba a usar para medir la muestra. Una vez obtenidos los datos, solo hay que extrapolarlos a los valores originales en el paciente.

La dilución se realizó 1:10, usando 0.9 ml de agua ultra pura MilliQ y 0.1 ml de la muestra a estudiar.

2.6. Análisis mediante Espectrofotometría HPLC

El espectrofotómetro hace uso de la transmisión de la luz visible o ultravioleta (Uv/Vis) a través de una solución a analizar, para determinar la concentración de un soluto dentro de la solución. De este modo, nosotros analizaremos la bupivacaina (solute) dentro de las muestras de líquido sinovial del paciente (solución).

El análisis de la concentración de bupivacaina en las muestras de líquido sinovial según el tiempo, se realizó por medio de espectrofotometría Uv/Vis. Para ello se utilizó una cubeta de cuarzo, no de vidrio ya que el cuarzo permite el análisis ultravioleta. Los rayos

ultravioleta si pueden penetrar el cuarzo realizando un análisis UV mientras que si hubiéramos usado una cubeta de vidrio, la luz ultravioleta no habría atravesado el vidrio y la muestra no se podría haber analizado.

Dada la geometría del espectrofotómetro, lo que mide en la fotocelda es la cantidad de luz que llega a la celda. El medidor de voltaje lee la cantidad de luz transmitida. La transmisión de la luz no es una función lineal, es más bien una función de tipo exponencial.

Podemos monitorizar el nivel de transmisión y convertirlo en un porcentaje de la cantidad de luz transmitida en comparación a cuando ningún colorante está presente.

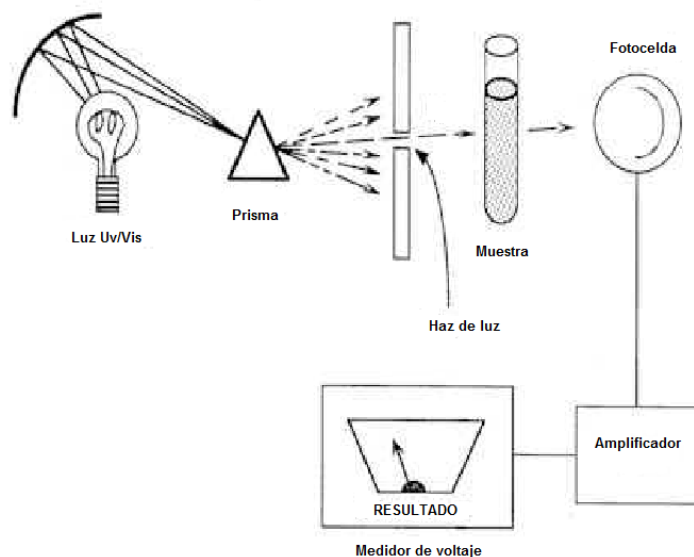


Figura 2.1. proceso de lectura de una muestra dentro del espectrofotómetro.

Para poder usar el espectrofotómetro, fue necesario hacer un llamado "blanco" inicial por el cual el espectrofotómetro calibra la longitud de onda (λ) deseada.

La muestra "blanco" (no contiene soluto o fármaco) es colocada en el porta celda, y el espectrofotómetro reajustado para leer transmitancia de 100 %. Una vez hecho este paso, todas la demás medidas serán realizadas solo introduciendo las muestras en la cubeta de cuarzo y medidas por el espectrofotómetro.

Para realizar el blanco usamos la primera muestra recogida en el paciente, la correspondiente al líquido sinovial previo a la administración de la bupivacaina.

Para bupivacaina el análisis de espectrofotometría se realizó a una λ 230 nm (Verron 2010, Park 1998) para las muestras a 15, 30 y 60 minutos de exposición.

Una vez calibrado el espectrofotómetro con el blanco, nos dispusimos a analizar las muestras. Primero la muestra a tiempo 0 correspondiente a la administración del fármaco, obteniendo una longitud de onda determinada. Y posteriormente se analiza la muestra correspondiente al tiempo de exposición a la bupivacaina según el grupo, obteniendo otra longitud de onda.

A todas las longitudes de onda obtenidas se les realizó una media para obtener la longitud de onda media para cada uno de los tres tiempos de estudio y el tiempo 0.

2.7. Extrapolación de resultados

Los resultados finales obtenidos de las muestras de pacientes una vez analizados por espectrofotometría, fueron las medias de las longitudes de onda (absorbancias nm) totales obtenidas. Para saber la concentración de fármaco correspondiente a cada muestra estudiada, en microgramos por mililitro ($\mu\text{g/ml}$), se realizó una extrapolación de los datos.

Para ello realizamos una curva de calibración de absorbancias usando concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ conocidas de bupivacaina que fueron previamente analizadas por el espectrofotómetro a λ 230 nm. En concreto las siguientes concentraciones: bupivacaina pura, 5 $\mu\text{g/ml}$, 3 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ y 0.01 $\mu\text{g/ml}$.

De esta forma se obtuvieron longitudes de onda de concentraciones de bupivacaina conocidas que se extrapolaron con las longitudes de ondas en los tres tiempos de las muestras de los pacientes, obteniendo la concentración final en $\mu\text{g/ml}$ de bupivacaina a 15, 30 y 60 minutos de los pacientes estudiados.

2.8. Análisis estadístico.

Se realizó un análisis descriptivo de las principales variables, para ello en el caso de las variables cualitativas recogidas por medio de la espectrofotometría, se va a obtener para cada una de las variables su distribución de frecuencias (número de casos y porcentaje) y se presenta como gráficos el diagrama de barras y/o el diagrama de sectores.

Para el caso de las variables cuantitativas se presenta para cada una de ellas: media, mediana, desviación típica, mínimo y máximo y como representación grafica el histograma y la caja con bigotes.

Además, se realiza un análisis bivalente de comparación de medias. En un caso, se realizó la Prueba de Wilcoxon, indicada para muestras apareadas, para comprobar si existen diferencias significativas entre el nivel de concentración del líquido en la muestra 0, con la concentración de su muestra correspondiente, (15 minutos, 30 minutos y 60 minutos).

En un segundo lugar, se realizan sendos Test U de Mann-Whitney, para comprobar si existen diferencias significativas en las concentraciones entre las diferentes muestras a los 15 minutos, 30 minutos y 60 minutos.

En todo momento se utilizaron pruebas no paramétricas ya que el tamaño muestral es pequeño.

3. Resultados.

Hemos llevado a cabo este estudio con participantes seleccionados y distribuidos en tres grupos según el tiempo de exposición a la bupivacaina (grupo 1: 15 minutos; grupo 2: 30 minutos; grupo 3: 60 minutos). Según la metodología expuesta en el capítulo anterior se han obtenido los siguientes resultados.

3.1. Pacientes incluidos.

Las muestras de líquido sinovial fueron recogidas de 15 pacientes, no habiendo excluido ninguna de las muestras obtenidas.

Las muestras de los pacientes estudiados fueron de mujeres y varones, con edad media de 35 y 65 años sometidos a artroscopia de rodilla. Todos los pacientes cumplían los criterios de inclusión requeridos.

3.2. Resultados de las técnicas analíticas.

3.2.1. Curva de calibración.

Antes de analizar los resultados obtenidos en las muestras a estudio, se realizó una curva de calibración. Esta curva nos servirá para obtener la absorbancia en nanómetros (nm), de diferentes concentraciones conocidas de bupivacaina que nos permitan compararlas con las muestras a estudio y de este modo extrapolar los datos, obteniendo los datos finales de la concentración de bupivacaina a 15, 30 y 60 minutos.

Para ello se analizó en el espectrofotómetro las concentraciones de bupivacaina diluidas en agua ultra pura MiliQ. Tabla 3.1.

Concentración de bupivacaina conocidas	Absorbancias obtenidas
Puro, sin diluir en MiliQ	3.905 nm
5 µg/ml	3.446 nm
3 µg/ml	2.674 nm
1 µg/ml	1.060 nm
0.05 µg/ml	0.135 nm

Tabla 3.1. Observamos que el resultado del espectrofotómetro con una muestra de bupivacaina pura, sin diluir en agua ultra pura, da el resultado más alto. A partir de esta concentración máxima, se realizaron otras cuatro diluciones más, obteniendo diferentes rangos de absorbancia para cada concentración hasta llegar a la concentración mínima de 0.05 µg/ml

3.2.2. Espectrofotómetro

Un espectrofotómetro se usa para el análisis químico de ciertos componentes, cuantificación de productos químicos disueltos en muestras o para cuantificar microorganismos. El espectrofotómetro usa un haz de luz a una longitud de onda determinada que es capaz de cuantificar el producto deseado expresado en nanómetros (nm). El espectrofotómetro hace uso de la transmisión de la luz a través de la solución con la bupivacaina determinando la concentración del fármaco en la muestra analizada. Los resultados obtenidos fueron los siguientes tabla 3.2:

Tiempo	Media absorbancias	Concentración tras extrapolar con la curva de extrapolación
Tiempo 0	2.464 nm	2.76 µg/ml
Tiempo 15 min.	2.310 nm	2.59 µg/ml
Tiempo 30 min.	2.232 nm	2.50 µg/ml
Tiempo 60 min.	1.760 nm	1.97 µg/ml

Tabla 3.2: Observamos la media de las absorbancias obtenidas de los tres tiempos estudiados. Además obtenemos la concentración de bupivacaina para cada tiempo expresado en µg/ml usando para ello los datos obtenidos en la curva de calibración para obtener la concentración de bupivacaina en relación a la absorbancia obtenida. Las comparaciones están relacionadas entre si observando cómo a mayor tiempo del fármaco en la articulación, la concentración de bupivacaina va disminuyendo.

A la vista de los resultados del espectrofotómetro, la concentración de bupivacaína (0,5%) disminuyó a 61.6 % en el minuto 0 (control) por dilución, en el minuto 15 fue de 57.5%, en el 30 de 55.8% y a los 60 minutos de 40.6%.

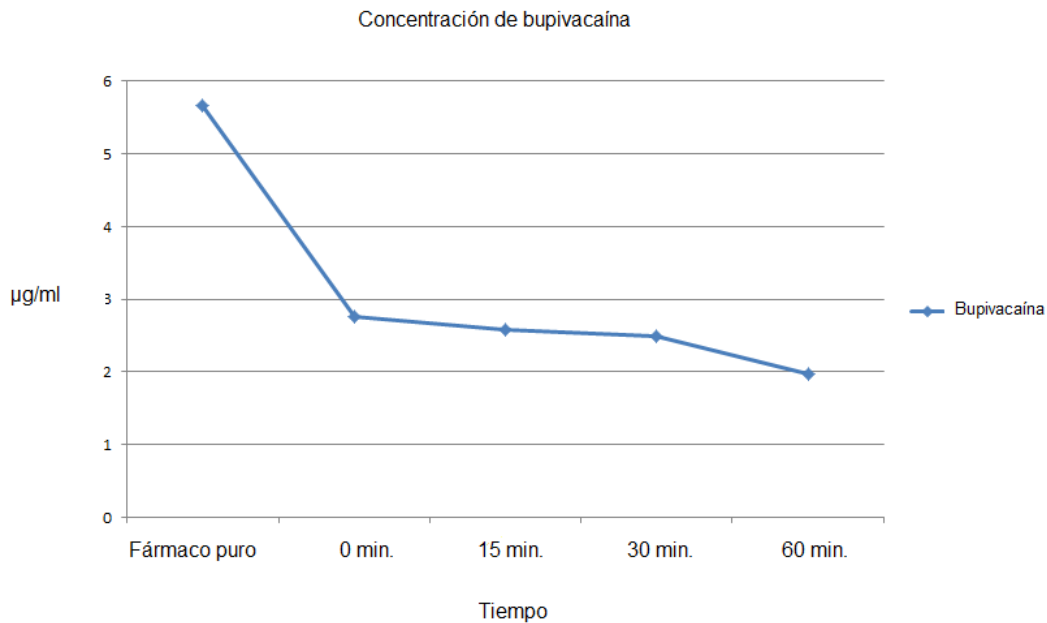


Figura 3.1.: gráfica de los resultados del análisis por espectrofotometría. Cada punto representa la concentración en µg/ml de las muestras de los 15 pacientes para los tres tiempos estudiados además de la concentración de la bupivacaína pura. Podemos comprobar cómo el fármaco disminuye desde el tiempo 0 de la administración. Se observa también una disminución de bupivacaina en la articulación a partir de los 30 minutos.

4. Discusión.

En este estudio hemos podido demostrar como la concentración intraarticular de bupivacaina tras inyectar una única dosis después de una intervención de artroscopia de rodilla, disminuye bruscamente al inyectar (hasta un 40%) y luego sigue disminuyendo progresivamente otro 20% tras los primeros 30 minutos.

Aunque se utilizan normalmente diferentes fármacos anestésicos durante una intervención de artroscopia de rodilla, la bupivacaína al igual que levobupivacaína o ropivacaina está siendo cada vez más utilizada por los anestesiólogos ya que su potencia es similar, y los efectos secundarios a nivel del SNC y cardiovascular son menores.

En bibliografía, los estudios sobre la duración de la bupivacaina en la articulación humana in vivo, son bastante escasos ya que la mayoría de los estudios valoran en realidad el dolor postoperatorio, la duración y actuación de la bupivacaina combinada con otros anestésicos. De esta forma, en la bibliografía consultada hemos observado que cada grupo de investigación ha estudiado por una parte, la relación del fármaco a lo largo de una escala de tiempo determinada, o por lo contrario ha evaluado la eliminación del fármaco según diferentes dosis de bupivacaina administrada.

Elkousy et al. en un ensayo realizado durante el 2013 con pacientes sometidos a cirugía de rodilla, compararon la permanencia de bupivacaina con otro fármaco, la morfina, para controlar el dolor postoperatorio. En este estudio, utilizaron una concentración de 10cc de 0.5% de bupivacaina obteniendo dos datos significativos. Pasadas 4 horas tras la administración de la bupivacaina, la concentración de este fármaco había descendido un 71.1%. Por lo contrario, transcurridas 24 horas, la bupivacaina en la articulación había disminuido un 52.95%. Frente a estos resultados obtenidos por este grupo de investigación, observamos que en nuestro estudio también existe una rápida eliminación de la bupivacaina dependiente del tiempo. De este modo, como ya se ha comentado anteriormente, transcurridos 30 minutos tras la administración del fármaco, obtuvimos un 55.8% de bupivacaina en las muestras analizadas y un 40.6% transcurrida una hora. De esta forma ambos estudios demuestran que la eliminación de la bupivacaina de la zona de la articulación es progresiva y exponencial.

El efecto o duración de la bupivacaina, en referencia a las dosis empleadas, también ha sido descrito por diferentes autores. En nuestro caso hemos utilizado una sola dosis ya que es la que normalmente es utilizada en quirófano. Covery et al. en un estudio realizado comparando bupivacaina y ropivacaina, encontraron que ambos fármacos se eliminaban a la misma velocidad y de una forma exponencial similar. En este caso utilizaron dos tiempos determinados para analizar la concentración del fármaco, 20 minutos y 180 minutos tras la administración de bupivacaina. La diferencia la encontraron en las diferentes concentraciones

de bupivacaína que usaron. De este modo observaron que, a concentraciones de 100 mg de bupivacaína, transcurridos 180 minutos, la concentración bajaba a 0.25 mg por litro de fármaco, mientras que a concentraciones mayores de bupivacaína, en concreto a 200 mg, se obtenían 0.46 mg/l transcurridos 180 minutos tras la administración. Estos datos concuerdan con otros visto en bibliografía y con los resultados de nuestro estudio ya que, como se observa en las figura 3.1. y la tabla 3.2., la concentración de bupivacaína va disminuyendo con relación al tiempo.

El uso de técnicas espectrofotométricas para el análisis y obtención de concentraciones de bupivacaína en determinados tiempos, es muy usado en bibliografía. Aunque en los artículos consultados se hace referencia principalmente a la permanencia del fármaco en la zona de la articulación inyectada, también se trata el tema del dolor en el paciente. En diversos estudios de Verron et al. y Park et al. donde comparan el dolor postoperatorio de diversos fármacos, usan el espectrofotómetro a longitud de onda de 230 nm obteniendo resultados similares en la concentración de bupivacaína en ambos estudios. De este modo, en ambos trabajos se observa una disminución progresiva de bupivacaína al igual que ha ocurrido en los artículos anteriormente comentados y en nuestro propio ensayo.

La posible limitación que había aparecido en trabajos *in vitro* previos a este queda resuelta ya que al realizarse este trabajo *in vivo*, obtenemos concentraciones de bupivacaína reales, pudiendo de esta forma comparar las concentraciones reales que se producen en la articulación de un paciente sometido a artroscopia de rodilla. Tras haber conseguido demostrar que la disminución de la concentración de bupivacaína *in vivo* viene relacionada con el tiempo, nuestro principal objetivo en este estudio ha sido realizar una curva de concentración-tiempo de la bupivacaína intraarticular tras una artroscopia de rodilla para los tiempos 15, 30 y 60 minutos.

Para estudiar la posible condrotoxicidad que produce la bupivacaína y los anestésicos asociados a este, se puede observar que, tras los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo*, a partir de los 30 minutos tras la administración, la concentración de bupivacaína va disminuyendo de forma exponencial con el tiempo. De este modo, tras haber demostrado que

la bupivacaina comenzaba a ser toxica a partir de los 60 minutos de exposición con el cartílago se demuestra que, el uso de bupivacaina en pacientes sometidos a artroscopia no tiene por qué afectar al cartílago de la articulación intervenida ya que la eliminación del fármaco es previa a la actividad condrotóxica de la bupivacaina.

5. Conclusiones

En conclusión, este estudio demuestra que la concentración de bupivacaina en la articulación en una intervención de artroscopia durante los primeros 15 minutos es de 61.6 %, disminuyendo de forma progresiva conforme pasa el tiempo hasta llegar a una concentración de 40.6% transcurridos 60 minutos. Por consiguiente, en el ámbito clínico se recomienda el uso de bupivacaina en las intervenciones de artroscopia ya que se presume que tras 30 minutos tras la administración del fármaco, este va disminuyendo de forma exponencial y progresiva hasta ser eliminado antes de poder causar algún tipo de toxicidad al cartílago que forma parte de la articulación.

CONCLUSION

CONCLUSION

- This study shows that an exposure in vitro to levobupivacaine and ropivacaine at clinical doses in a single shot longer than 60 minutes is chondrotoxic.
- Bupivacaine seem to be some less chondrotoxic that levobupivacaine and ropivacaine.
- This study suggests that, in the clinical setting, the use of levobupivacain or ropivacaine for pain control after knee surgery is not recommended if an exposure longer than 30 minutes to articular cartilage is presumed.
- Intra-articular bupivacaine concentration in normal doses, decrease in joint after injection and during the first 30 minutes in vivo.
- The use of bupivacaine in a single shot inyection is safe for cartilage, as most quantity of drug is removed after 30 min.

(Referencias) BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

- Albright GA. Cardiac arrest following regional anesthesia with etidocaine and bupivacaine. *Anesthesiology* 1979; 51: 285-286.
- Al-Metwalli R., Mowafi H., Ismail S., Siddiqui A., Al-Ghamdi A., Shafi M., El-Saleh A. Effect of intra-articular dexmedetomidine on postoperative analgesia after arthroscopic knee surgery. *British J. Anaesth.* 2008. 101 (3): 395-9.
- Baker JF, Walsh PM, Byrne DP, Mulhall KJ. (2011). In vitro assessment of human chondrocyte viability after treatment with local anaesthetic, magnesium sulphate or normal saline. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*; 19:1043-6.
- Baskan S., Taspinar V., Ozdogan L., Gulsoy K.Y., Erk G., Dikmen B., Gogus N. 2010. Comparison of 0.25% levobupivacaine and 0.25% bupivacaine for posterior approach interscalene brachial plexus block. *J Anesth.* 24:38–42
- Bogatch M., Ferachi B., Kyle B., Popinchalk S., Howell M., Ge D., You Z., Savoie F. (2010). Is chemical incompatibility responsible for chondrocyte death induced by local anesthetics. *American journal sports medicine*; 38:520-26.
- Bruce D., Lee A., Fagan D., Bowler G., Bloomfield P., Lundh R. Acute toxicity of ropivacaine compared with that of bupivacaine. *Anesth Analg.* 1989; 69:563-9.
- Burlacu CL, Buggy DJ. Update on local anesthetics: focus on levobupivacaine. *TherClin RiskManag* 2008 Apr; 4 (2): 381-392.
- Cappelleri G., Aldegheri G., Danelli G., Marchetti Ch., Nuzzi M., Lannandrea G., Casati A. 2005. Spinal Anesthesia with Hyperbaric Levobupivacaine and Ropivacaine for Outpatient Knee Arthroscopy: A Prospective, Randomized, Double-Blind Study. *Anesth Analg.* 101:77–82

-
- Chassaing V, Parier J. Artroscopia diagnóstico y quirúrgico de rodilla. Editorial Masson S.A. Barcelona 1987. 1ª edición: 1-7.
 - Chu C.R., Izzo N.J., Coyle C.H., Papas N.E., Logar A. (2008). The in vitro effects of bupivacaine on articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br.*; 90:814-20.
 - Chu C.R., Izzo N.J., Papas N.E., Fu F.H. (2006). In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. *Arthroscopy*; 22:693-99.
 - Covery P., Milligan K., Quinn P., Sjövall J., Gustafsson U. Efficacy and uptake of ropivacaine and bupivacaine after single intra-articular injection in the knee joint. *Br. J. Anaesth.* 2001;87:570-6.
 - De Andrés J, Monzo E. Regional techniques for day surgery: intraarticular anesthesia and analgesia. *Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management* 2000; 4: 54-61.
 - Delgado Martínez, A. Cirugía ortopédica y traumatología.2012. Editorial Panamericana 192-194.
 - Dogan N., Erman A., Kizilkaya M. The effects of bupivacaine and neostigmine on articular cartilage and synovium in the rabbit knee joint. *J. International med. Research.* 2004. 32: 513-519.
 - Elkousy H., Kannan V., Calder C., Zumwalt J., O'Connor D., Woods W. Intra-articular Morphine versus bupivacaine for postoperative pain management. *Orthopedics.* 2013.vol 36 n9 1121-1127.
 - Freshney RI. (2000). Specialized cells. In: *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* 4th. ed. New York: Wiley-Liss;. 367-70.
 - Gomoll A.H., Yanke A.B.,Kang R.W., Chubinskaya S., Williams J.M., Bach B.R., Cole B.J. (2009). Long-Term Effects of Bupivacaine on Cartilage in a Rabbit Shoulder Model. *Am J Sports Med* ; 37:72-77.

-
- Grishko V., Xu M., Wilson G., Pearsall A.W. 2010. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. *J Bone Joint Surg Am.* 92(3):609-18.
 - Han C., Lee D., Yang I. Intra-synovial Ropivacaine and Morphine for pain relief after total knee arthroplasty. – A prospective, randomized, double blind study. *Yosei Medical Journal.* 2007. Vol. 48, nº 2, pp. 295-300.
 - Junquera L.C., Carneiro J. 1996 *Histología básica: texto y atlas.* Masson, 111-119
 - Kamath R., Strichartz G., Rosenthal D. (2008). Cartilage toxicity from local anesthetics. *Skeletal Radiol;* 37:871–73.
 - Koene GCR, Jackson R, Glasgow N, McLELLAND. Arthroscopic partial meniscectomy: early results. *J Bone Joint Surg* 1982; 64: 29-34.
 - Lee-Son S, Wang GK, Concus A, Crill E, Strichartz G. Stereoselective inhibition of neuronal sodium channels by local anesthetics. Evidence for two sites of action? *Anesthesiology* 1992; 77: 324-335.
 - Markham A., D Faulds. Ropivacaine. A review of its pharmacology and herapeutic use in regional anaesthesia. *Drugs.* 1996; 52: 429-49
 - Mather LE, SE Copeland and LA Ladd. Acute toxicity of local anesthetics: underlying pharmacokinetic and pharmacodynamics concepts. *Reg Anesth Pain Med* 2005; 30: 553-66.
 - Morrison S, Dominguez J, Frascarolo P, Reiz S. A comparison of the electrocardiographic cardiotoxic effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine in anesthetized swine. *Anesth Analg* 2000; 90: 1308-1314.
 - Park E., Maniar M., Shah J.C. 1998. Biodegradable polyanhydride devices of cefazolin sodium, bupivacaine, and taxol for local drug delivery: preparation, and

kinetics and mechanism of in vitro release. *Journal of Controlled Release* 52. 179–189.

- Piper S.L., Kim H.T. (2008). Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.*; 90:986-91.
- Stevens A. Lowe J., 2006. *Histología humana*, Elsevier Mosby, 56-69.
- Tetzlaff JE. The pharmacology of local anesthetics. *Anesthesiology Clinics of North America* 2000; 18: 217-233.
- Verron E.,Gauthier O.,Janvier P., Le Guen H., Holopherne D.,Cavagna R., Bouler J. 2010. Analgesic properties of calcium phosphate apatite loaded with bupivacaine on postoperative pain. *Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 94B:89–96.
- Webb S. T., Ghosh S. (2009). Intra-articular bupivacaine: potentially chondrotoxic?. *Br J Anaesthesia*; 102:439-441
- Zink W, Graf BM. The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine. *Curr Opin Anaesthesiol* 2008; 21 (5): 645-650.

ANEXOS

ANEXO I

ANEXO II

ANEXO III

ANEXO IV

ANEXO V
