

# Efeitos Neuromusculares *In Vitro* e *In Vivo* do Atracúrio e do Rocurônio em Ratos Submetidos a Tratamento de Sete Dias com Carbamazepina\*

## *In Vitro and In Vivo Neuromuscular Effects of Atracurium and Rocuronium in Rats Treated with Carbamazepine for Seven Days*

Caroline Coutinho de Barcelos<sup>1</sup>, Angélica de Fátima de Assunção Braga, TSA<sup>2</sup>, Franklin Sarmiento da Silva Braga<sup>3</sup>, Gloria Braga Potério, TSA<sup>2</sup>, Samanta Cristina Antoniassi Fernandes<sup>1</sup>, Yoko Oshima Franco<sup>4</sup>, Léa Rodrigues Simioni<sup>5</sup>

### RESUMO

Barcelos CC, Braga AFA, Braga FSS, Potério GB, Fernandes SCA, Franco YO, Simioni LR — Efeitos Neuromusculares *In Vitro* e *In Vivo* do Atracúrio e do Rocurônio em Ratos Submetidos a Tratamento de Sete Dias com Carbamazepina.

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** Trata-se de um estudo experimental que investigou *in vitro* e *in vivo* o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio e atracúrio em ratos tratados com carbamazepina e determinou as concentrações de citocromo P450 e b5 redutase em microsomas hepáticos.

**MÉTODO:** Ratos foram tratados por sete dias com carbamazepina (CBZ) — 40 mg.kg<sup>-1</sup> pelo método de gavagem e sacrificados no oitavo dia sob anestesia com uretana. As preparações *in vitro* e *in vivo* foram montadas de acordo com as técnicas de Bulbring e de Leeuwijn e Wolters, respectivamente. As concentrações e doses utilizadas dos bloqueadores nas preparações *in vitro* e *in vivo* foram, respectivamente, 20 µg.mL<sup>-1</sup> e 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> para atracúrio (ATC); 4 µg.mL<sup>-1</sup> e 0,6 mg.kg<sup>-1</sup> para rocurônio (ROC). Cada protocolo teve um n = 5 e as respostas foram observadas por 60 minutos. Os efeitos do ATC e ROC foram avaliados nas preparações de ratos tratados (CBZ<sub>i</sub>) e comparados com os observados nas de ratos não-tratados (CBZ<sub>st</sub>). As concentrações de citocromo P450 e b5 redutase foram determinadas em microsomas isolados de fígados de ratos tratados (CBZ<sub>i</sub>) e comparadas com as obtidas em ratos não tratados (CBZ<sub>st</sub>).

**RESULTADOS:** A carbamazepina não alterou a amplitude das respostas musculares; *in vitro* e *in vivo*, não houve diferença entre o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio nas preparações CBZ<sub>i</sub> versus CBZ<sub>st</sub>; o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio nas preparações CBZ<sub>i</sub> foi potencializado *in vitro*. A carbamazepina não alterou as concentrações de citocromo P450 e b5.

**CONCLUSÕES:** O tratamento por sete dias com carbamazepina não influenciou no bloqueio produzido pelo atracúrio, e alterou *in vitro* os efeitos do rocurônio. O tempo de tratamento não foi suficiente para causar indução enzimática e diminuir a sensibilidade ao rocurônio.

**Unitermos:** ANIMAIS: ratos; ANTICONVULSIVANTE: carbamazepina; BLOQUEADORES NEUROMUSCULARES, adespolarizante: atracúrio, rocurônio.

### SUMMARY

Barcelos CC, Braga AFA, Braga FSS, Potério GB, Fernandes SCA, Franco YO, Simioni LR — *In Vitro and In Vivo Neuromuscular Effects of Atracurium and Rocuronium in Rats Treated with Carbamazepine for Seven Days.*

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** This experimental study investigated the *in vitro* and *in vivo* neuromuscular blockade of rocuronium and atracurium in rats treated with carbamazepine and determined the concentration of cytochrome P450 and b5 reductase in hepatic microsomes.

**METHODS:** Rats were treated with carbamazepine (CBZ) — 40 mg.kg<sup>-1</sup> by gavage and sacrificed on the eighth day under anesthesia with urethane. *In vitro* and *in vivo* preparations followed the techniques of Bulbring and Leeuwijn and Wolters, respectively. Concentrations and doses of the neuromuscular blockers used in *in vitro* and *in vivo* preparations were, respectively, 20 µg.mL<sup>-1</sup> and 0.5 mg.kg<sup>-1</sup> for atracurium (ATC); and 4 µg.kg<sup>-1</sup> and 0.6 mg.kg<sup>-1</sup> for rocuronium (ROC). Each protocol had an n = 5 and the response was observed for 60 minutes. The effects of ATC and ROC were evaluated in the preparations of rats treated with carbamazepine (CBZ<sub>i</sub>) and compared to those of non-treated rats (CBZ<sub>st</sub>). The concentration of cytochrome P450 and b5 reductase were determined in hepatic chromosomes of rats treated with carbamazepine (CBZ<sub>i</sub>) and non-treated rats (CBZ<sub>st</sub>).

**RESULTS:** Carbamazepine did not change the amplitude of neuromuscular response; differences in the neuromuscular blockade produced by atracurium in CBZ<sub>i</sub> preparations were not observed, *in vitro* or *in vivo*, when compared with CBZ<sub>st</sub>; the neuromuscular blockade produced by rocuronium in CBZ<sub>i</sub> preparations was potentiated *in vitro*. Carbamazepine did not change the concentrations of cytochrome P450 and b5.

**CONCLUSIONS:** Seven-day treatment with carbamazepine did not change the neuromuscular blockade produced by atracurium, but altered the *in vitro* effects of rocuronium. The duration of the treatment was not enough to cause enzymatic induction and decrease the sensitivity to rocuronium.

**Key Words:** ANIMALS, rats; ANTICONVULSANTS, carbamazepine; NEUROMUSCULAR BLOCKERS, non-depolarizing: atracurium, rocuronium.

\*Recebido do (Received from) Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (FCM-UNICAMP), Campinas, SP

1. Mestre em Farmacologia pelo Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da FCM-UNICAMP

2. Professora-Associada do Departamento de Anestesiologia da FCM-UNICAMP

3. Professor-Doutor do Departamento de Anestesiologia da FCM-UNICAMP

4. Pesquisadora Colaboradora Voluntária do Departamento de Farmacologia da FCM-UNICAMP

5. Professora-Associada do Departamento de Farmacologia da FCM-UNICAMP

Apresentado (Submitted) em 26 de fevereiro de 2007

Aceito (Accepted) para publicação em 5 de dezembro de 2007

Endereço para correspondência (Correspondence to):

Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Rua Luciano Venere Decourt, 245 — Cidade Universitária

13084-040 Campinas, SP

E-mail: franklinbraga@terra.com.br

© Sociedade Brasileira de Anestesiologia, 2008

## INTRODUÇÃO

Muitos são os fármacos utilizados nos períodos pré ou perioperatório que podem interferir na transmissão neuromuscular ou nas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos bloqueadores neuromusculares, dificultando ou potencializando o efeito dos mesmos. Entre os fármacos que podem alterar os efeitos dos bloqueadores neuromusculares encontram-se os anestésicos locais, agentes anestésicos voláteis, antibióticos aminoglicosídeos, anticonvulsivantes, antidirítmicos, magnésio, lítio, bloqueadores de canais de cálcio e outras<sup>1-7</sup>.

Os anticonvulsivantes são muito utilizados no tratamento de epilepsia, transtorno bipolar e várias formas de neuropatias. Dentre os mais indicados estão a fenitoína, a vigabatrina, a carbamazepina, o valproato, o fenobarbital e a lamotrigina<sup>8-12</sup>. O bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes é o mecanismo primário de ação desses agentes. Há redução da excitabilidade elétrica das membranas celulares, necessária para a geração de um potencial de ação<sup>10</sup>. Além disso, por inibirem a GABA transaminase, potencializam a inibição sináptica mediada pelo GABA<sup>8-10</sup>. Alguns desses fármacos parecem atuar por meio de um terceiro mecanismo, que consiste em inibição dos canais de cálcio do tipo L e em outros subtipos de canais de cálcio voltagem-dependentes<sup>8,10</sup>.

A carbamazepina, derivada dos agentes antidepressivos tricíclicos e eficaz no tratamento de crises parciais complexas é também utilizada no tratamento de vários tipos de dor neuropática, incluindo a de origem diabética<sup>11-12</sup>. Atualmente é um dos agentes antiepiléticos mais utilizados, sendo algumas vezes útil no tratamento da doença maníaco-depressiva<sup>8</sup>.

Embora inúmeros estudos tenham sido realizados para investigar os efeitos dos anticonvulsivantes nas respostas musculares e sua interação com bloqueadores neuromusculares, os resultados ainda são conflitantes. Alguns estudos mostraram que os anticonvulsivantes modificam as respostas aos bloqueadores neuromusculares, potencializando, diminuindo ou mesmo não alterando os seus efeitos<sup>13-19</sup>. Portanto, o estudo dessas interações pode ser interessante na prática anestésica ou em pacientes críticos. O estudo realizado em ratos tratados (CBZ<sub>i</sub>) ou não (CBZ<sub>st</sub>) com carbamazepina, por um período de sete dias, teve por objetivo avaliar *in vitro* e *in vivo* o efeito da carbamazepina na transmissão neuromuscular e a sua influência no bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e pelo rocurônio, bem como as concentrações de citocromo P450 e b5 redutase em microsomas hepáticos.

## MÉTODO

Trata-se de estudo experimental *in vitro* e *in vivo* e os procedimentos usados estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro

de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Foram utilizados ratos machos de linhagem Wistar, com peso entre 180 e 250 g, fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp, Campinas (SP). Os animais foram tratados por sete dias com carbamazepina (40 mg.kg<sup>-1</sup>) pelo método da gavagem, mantidos em gaiolas, em temperatura e iluminação controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e receberam água e ração *ad libitum*.

### Estudo das respostas musculares

Para o estudo *in vitro*, utilizou-se a preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (NFD). Os animais (n = 5), sob anestesia com uretana (1,2 mg.kg<sup>-1</sup>, via intraperitoneal), foram sacrificados no oitavo dia após tratamento com carbamazepina e a preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por Bulbring<sup>21</sup>. Os hemidiafragmas com os nervos frênicos correspondentes foram retirados e fixados em cuba, contendo 40 mL de solução nutritiva de Tyrode com a seguinte composição mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl<sub>2</sub> 1,8; NaHCO<sub>3</sub> 11,9; MgCl<sub>2</sub> 0,25; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 e glicose 11. A preparação foi aerada constantemente com carbogênio (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) e mantida a 37°C. O nervo foi colocado sobre eletrodos de platina ligados a um estimulador Grass S48. O diafragma foi mantido por sua porção tendinosa sob tensão constante (5 g) por meio de um fio ligado a um transdutor isométrico Load Cell BG50 GMS, e submetido à estimulação indireta de 0,1 Hz de frequência e duração de 0,2 mseg e as respostas musculares foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400.

Para o estudo *in vivo*, a preparação foi montada segundo técnica proposta por Leeuwijn e Wolters<sup>22</sup>. Os ratos foram anestesiados com uretana (1,2 mg.kg<sup>-1</sup>), submetidos a traqueostomia e mantidos em ventilação mecânica com respirador Hugo Basile (mod. 7025), regulado para manter volume corrente de 1,2 mL.kg<sup>-1</sup> de peso corporal e frequência respiratória de 70 movimentos/min. Após a dissecação e secção do tendão do músculo tibial anterior e do nervo isquiático foi realizada a trepanação da tibia para a fixação do membro a uma base de cortiça. O tendão do músculo tibial anterior foi conectado a um transdutor isométrico (BG 50g) e este ao fisiógrafo (Gould RS 4300). O coto distal do nervo isquiático foi estimulado (estimulador Grass S48) por meio de eletrodos nele fixados, utilizando-se estímulos supra-maximais de 0,2 ms de duração e frequência de 0,5 Hz. Após o registro da resposta-controle e a verificação do perfeito estado da preparação, atracúrio e rocurônio foram injetadas na veia peniana.

No estudo *in vitro*, as concentrações empregadas de atracúrio e rocurônio foram de 20 µg.mL<sup>-1</sup> e 4 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente; em *in vivo* foram utilizadas doses de 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> e 0,6 mg.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. As concentrações utilizadas foram escolhidas com base no grau de bloqueio produzido pelas drogas, após a realização de curva dose-resposta

(não mostrado). As respostas musculares à estimulação indireta foram registradas antes e a cada 15 minutos, durante 60 minutos após a administração da droga estudada. Nas preparações *in vitro* e *in vivo* foram avaliadas: 1) amplitude das respostas musculares em preparação de ratos tratados com a carbamazepina; 2) o efeito do atracúrio e do rocurônio nas respostas musculares em preparações de ratos tratados (CBZ<sub>t</sub>) ou não (CBZ<sub>st</sub>) com carbamazepina.

#### Estudo das concentrações de citocromo P450 e b5 redutase

Para a determinação das concentrações de citocromo P450 e b5 redutase nos microsomos hepáticos, foram utilizados fígados retirados dos ratos CBZ<sub>t</sub> (G2), empregados para o estudo das respostas musculares *in vitro* e *in vivo*. Constituiu-se um grupo-controle – G1 (CBZ<sub>st</sub>, n = 5) que recebeu apenas solução fisiológica durante sete dias. Foi executado o seguinte procedimento: exposição do fígado após incisão ventral; com auxílio de um cateter, foram injetados 50 mL de solução fisiológica sem heparina no ventrículo cardíaco, até o fígado obter uma coloração esbranquiçada, quando foi retirado e congelado em nitrogênio líquido. Foram isolados microsomos hepáticos a partir de fígados individuais. Os tecidos foram homogeneizados a mão com tampão fosfato de potássio que foi centrifugado a 10.000 × g por 20 minutos (Centrífuga Beckman Avanti J-20 XPI). O sobrenadante foi coletado e ultracentrifugado a 100.000 × g por 1 hora. Os microsomos foram armazenados em freezer a -80°C para posterior dosagem de proteínas totais, em que foi utilizado o método colorimétrico de Bradford (1976) tendo o BSA como padrão. As concentrações específicas de citocromo P450 e b5 foram determinadas, utilizando-se a concentração de b5 com NADH (1 mM) como redutor e a concentração de P450 com DTN (2mM) como redutor e CO (monóxido de carbono) como ligante. Para análise, utilizou-se um espectrofotômetro de placas (Biotek Powerwave 2). As concentrações dos citocromos foram calculadas segun-

do a fórmula de Lambert-Beer ( $A/C.L.\epsilon$ ), e relacionadas com a concentração de proteínas totais da amostra de microsomos. Em que:

A= delta absorbância;

$\epsilon$ = absorbância específica: P450 = 91/mM cm e b5 = 112/mM cm;

L = pista óptica da cubeta, cm;

C = concentração de proteínas microsomais (mg proteína.mL<sup>-1</sup>).

Os resultados foram expressos em média e desvios-padrão. A amplitude das respostas musculares foi comparada antes e 60 minutos após a administração dos fármacos. As concentrações de P450 e b5 redutase obtidas em fígados de ratos previamente tratados com carbamazepina (CBZ<sub>t</sub>) foram comparadas com as do grupo-controle (solução fisiológica, CBZ<sub>st</sub>). Utilizou-se o teste *t* de Student, assumindo-se o nível de significância de 5% ( $\alpha = 5\%$ ). O poder do teste foi calculado e obteve-se  $\beta > 20\%$  (poder  $> 80\%$ ).

#### RESULTADOS

##### Das respostas musculares

Nas preparações *in vitro* (nervo frênico – diafragma de rato) e *in vivo* (nervo isquiático poplíteo externo – músculo tibial anterior) de ratos expostos a carbamazepina (40 mg.kg<sup>-1</sup>), não houve alterações significativas na amplitude das respostas musculares à estimulação indireta (Figuras 1 e 2). *In vitro*, o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio nas preparações de ratos tratados (CBZ<sub>t</sub>) foi 70,0 ± 8,16%, sem diferença significativa em relação ao obtido (74,7 ± 5,05%) nas preparações de ratos não-tratados (CBZ<sub>st</sub>) (Figura 3).

Em relação ao rocurônio, nos ratos CBZ<sub>t</sub> o bloqueio neuromuscular foi de 85,3 ± 17,52% versus 59,7 ± 20,1% nos CBZ<sub>st</sub>, com diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0003$ ) (Figura 4).

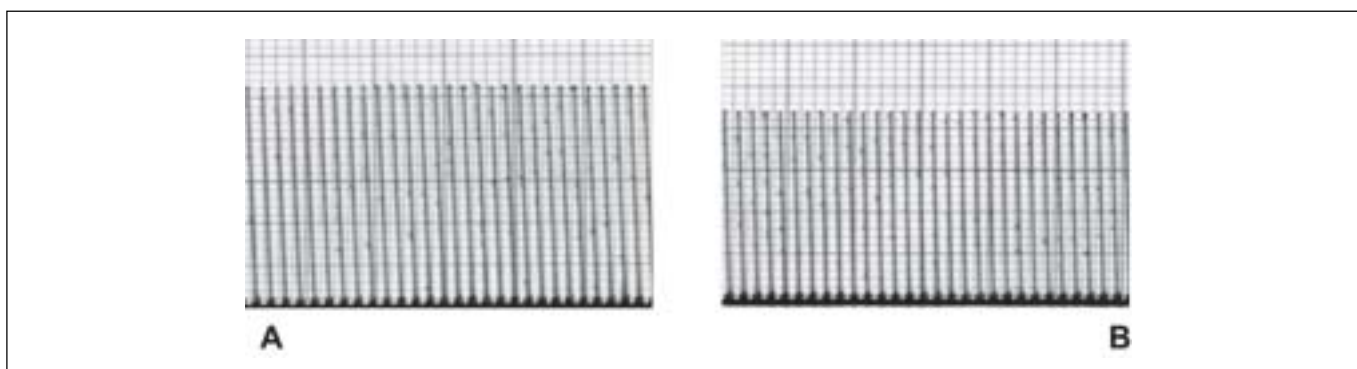


Figura 1 – Respostas Musculares à Estimulação Indireta em Preparação Nervo Frênico–Diafragma de Ratos Tratados com Carbamazepina (40 mg.kg<sup>-1</sup>) durante Sete Dias.  
A = início de estimulação; B = 60 minutos de estimulação.

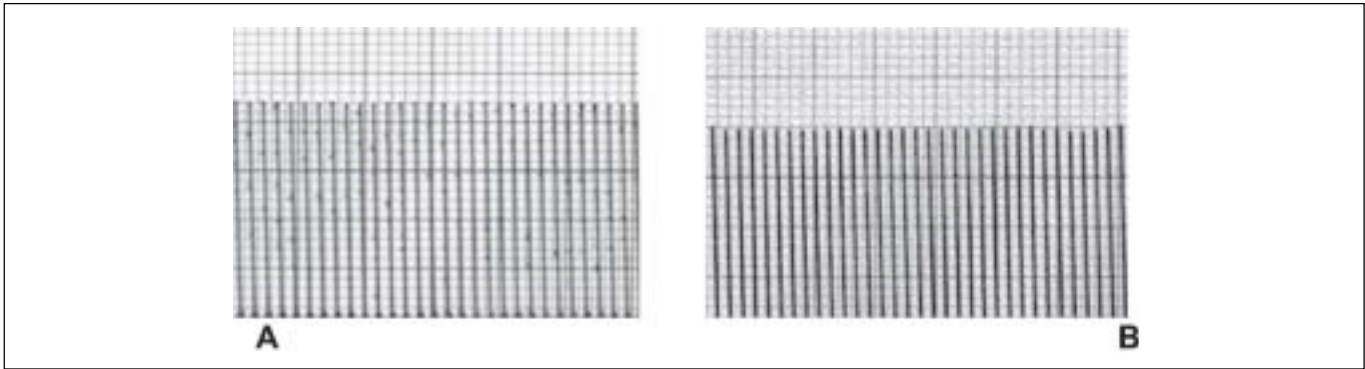


Figura 2 – Respostas Musculares à Estimulação Indireta em Preparação Nervo Isquiático – Músculo Tibial Anterior de Ratos Tratados com Carbamazepina (40 mg.kg<sup>-1</sup>), durante Sete Dias. A = início de estimulação; B = 60 minutos de estimulação.

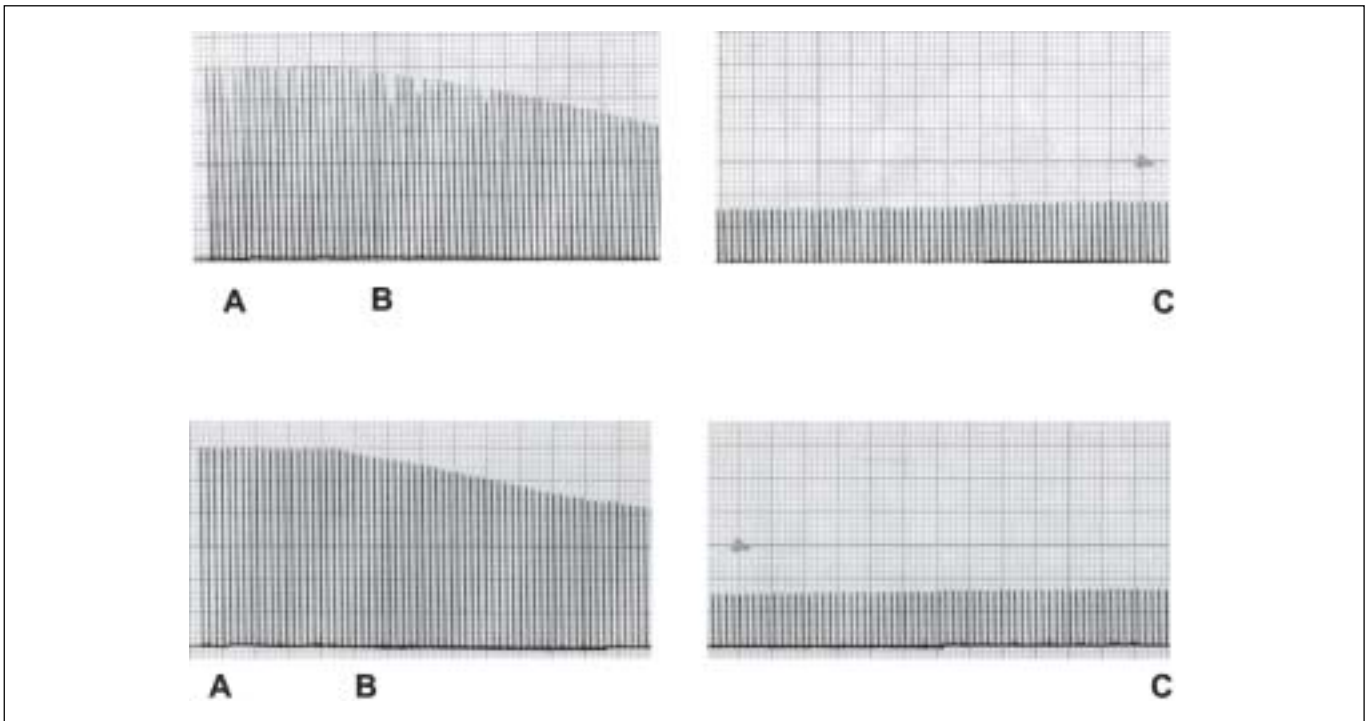


Figura 3 - Efeito do Atracúrio (20 µg.mL<sup>-1</sup>) nas Respostas Musculares à Estimulação Indireta em Preparação Nervo Frênico–Diafragma de Ratos Tratados (superior) e Não-Tratados com Carbamazepina (40 mg.kg<sup>-1</sup> - inferior). A = início de estimulação; B = adição de atracúrio; C = 60 minutos de estimulação.

Nos experimentos *in vivo*, o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio, em ratos CBZ<sub>t</sub> foi  $56,87 \pm 9,73\%$ , sem diferença significativa em relação ao obtido ( $56,5 \pm 12,0\%$ ) em ratos CBZ<sub>st</sub> (Figura 5).

Nos ratos CBZ<sub>t</sub>, o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio foi de  $78,9 \pm 18,39\%$ , sem diferença significativa em relação aos ratos CBZ<sub>st</sub> ( $65,8 \pm 6,92\%$ ) (Figura 6).

#### Das concentrações de citocromo P450 e b5 redutase

As concentrações de citocromos P450 e b5 redutase em microsossomos hepáticos nos dois grupos (CBZ<sub>st</sub> e CBZ<sub>t</sub>) foram: CBZ<sub>st</sub> (0,43 e 0,45 nmol/mg proteína, respectivamente); CBZ<sub>t</sub> (0,39 e 0,37 nmol.mg<sup>-1</sup> proteína, respectivamente), sem diferença significativa (Figura 7).

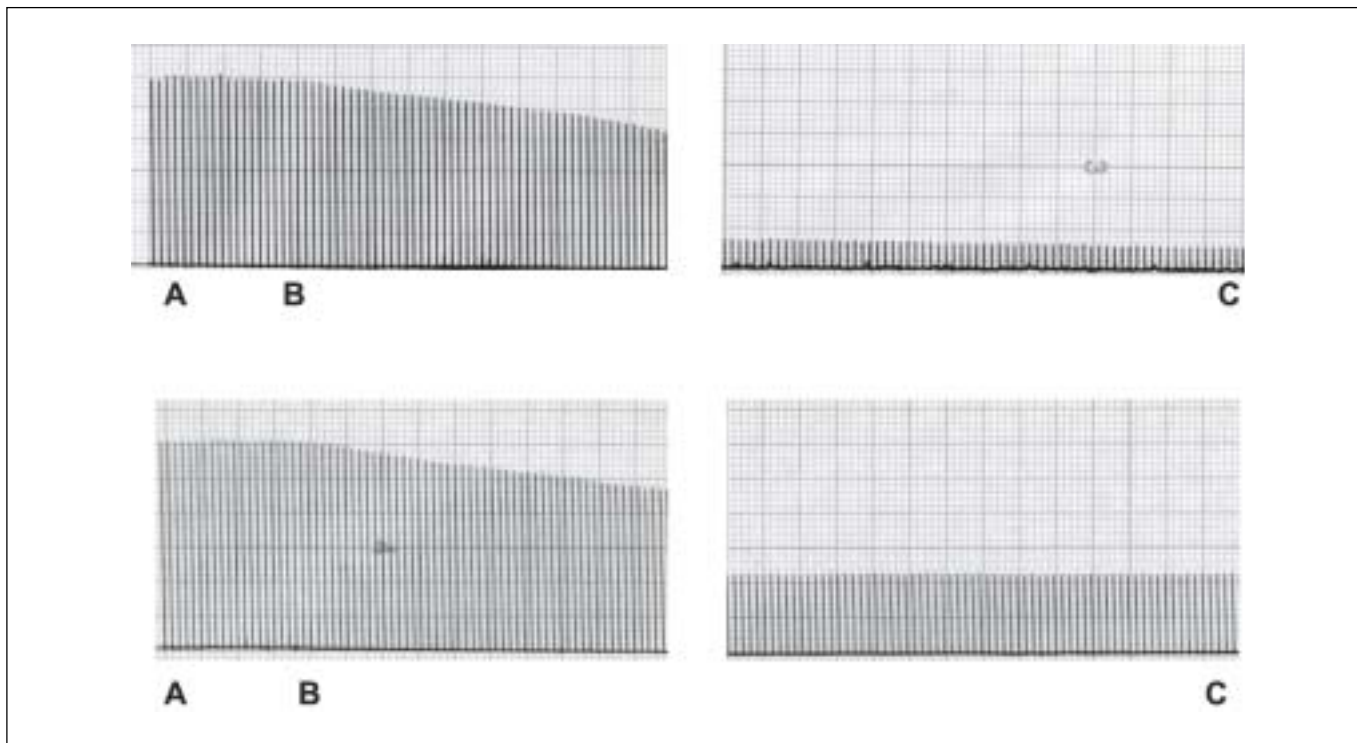


Figura 4 – Efeito do Rocurônio ( $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) nas Respostas Musculares à Estimulação Indireta em Preparação Nervo Frênico–Diafragma de Ratos Tratados (superior) e Não-Tratados com Carbamazepina ( $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  - inferior). A = início de estimulação; B = adição de rocurônio; C = 60 minutos de estimulação.

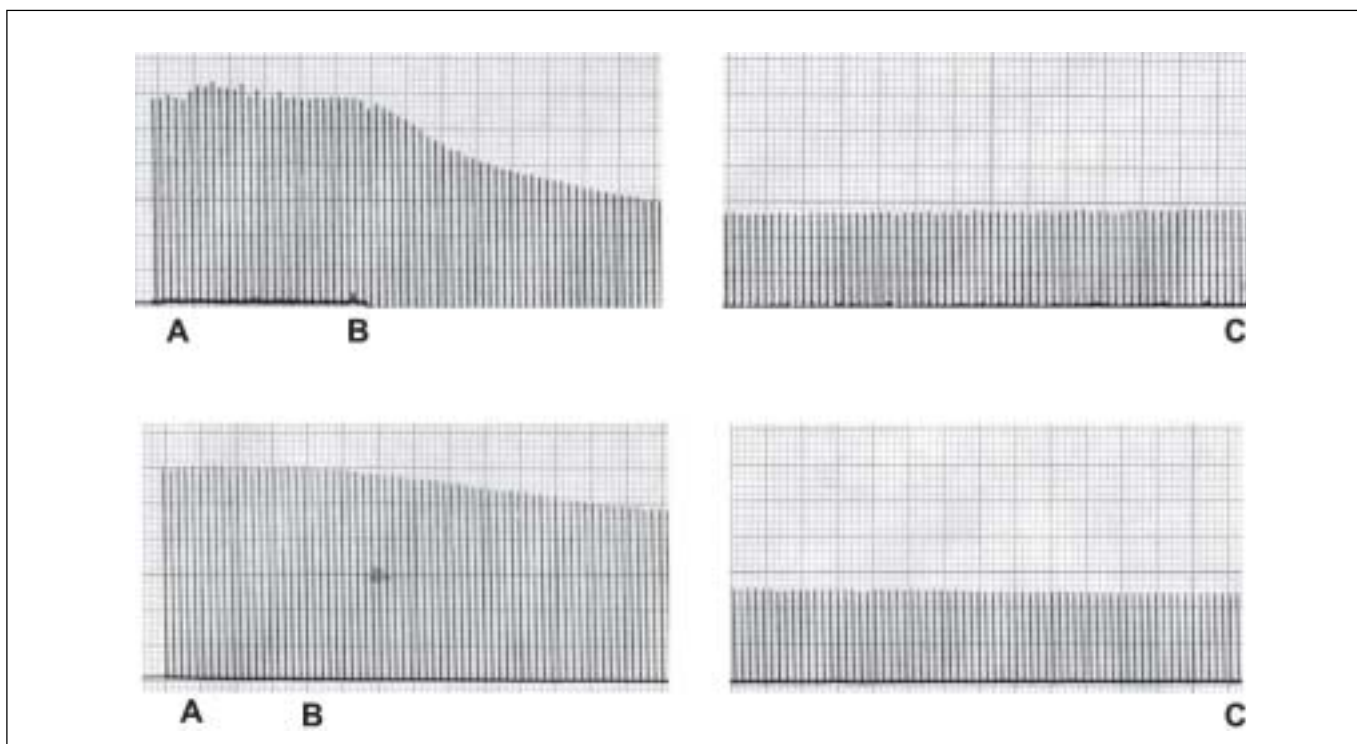


Figura 5 – Efeito do Atracúrio ( $0,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) nas Respostas Musculares à Estimulação Indireta em Preparação Nervo Isquiático Poplíteo Externo – Músculo Tibial Anterior de Ratos Tratados (superior) e Não-Tratados com Carbamazepina ( $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  - inferior). A = início de estimulação; B = injeção de atracúrio; C = 60 minutos de estimulação.



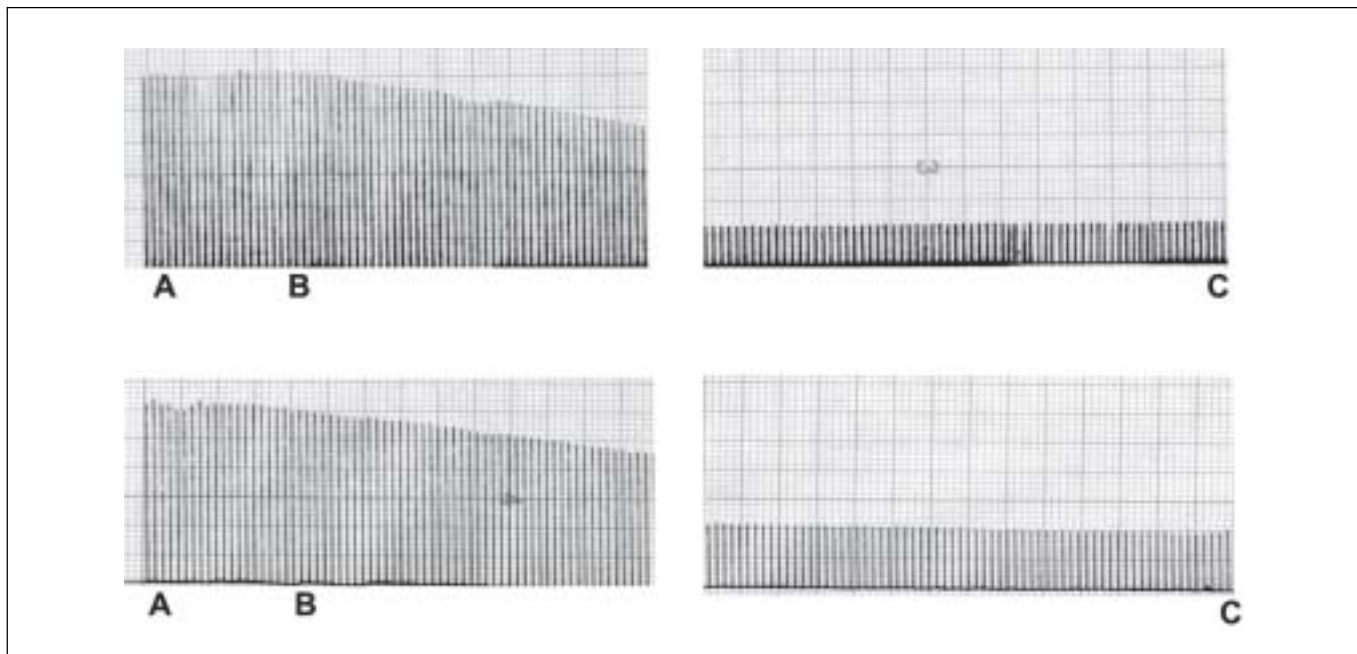


Figura 6 – Efeito do Rocurônio ( $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) nas Respostas Musculares à Estimulação Indireta em Preparação Nervo Isquiático Poplíteo Externo – Músculo Tibial Anterior de Ratos Tratados (superior) e Não-Tratados com Carbamazepina ( $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  - inferior). A = início de estimulação; B = injeção de rocurônio; C = 60 minutos de estimulação.

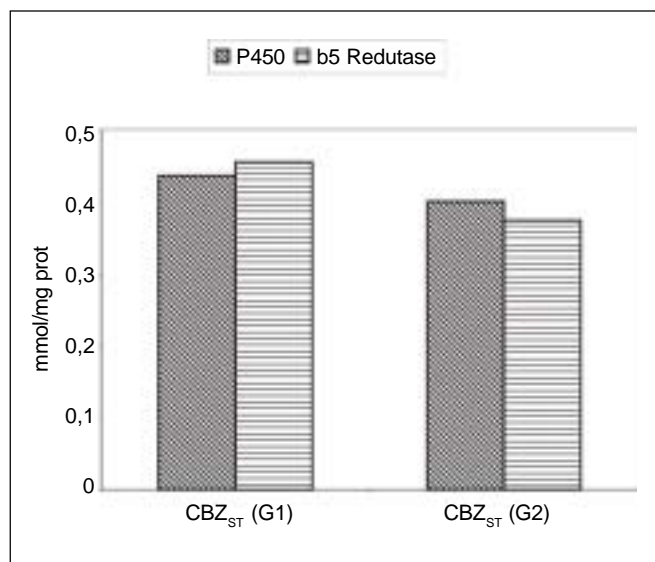


Figura 7 – Concentração de Citocromos P450 e b5 reductase em Microsomas de Ratos. Em CBZ<sub>st</sub> (G1) – solução fisiológica; CBZ<sub>st</sub> (G2) – tratamento com carbamazepina ( $40 \text{ mg.kg}^{-1}$ ).

## DISCUSSÃO

Há evidências de que as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos bloqueadores neuromusculares podem ser modificadas por fatores como idade, estado ácido-básico, temperatura, certas patologias (queimaduras, doen-

ças do neurônio motor superior e inferior) e fármacos <sup>1,6,7</sup>. Entre os fármacos utilizados nos períodos pré ou perioperatório, alguns podem atuar de forma isolada ou não na transmissão neuromuscular, assim como são capazes de potencializar ou atenuar o efeito dos bloqueadores neuromusculares.

As mudanças nas respostas desses fármacos podem ser decorrentes de alterações na sua distribuição, metabolismo e eliminação, assim como no nível de junção neuromuscular proximal ao sistema nervoso central ou na membrana muscular. Na junção neuromuscular, a interação pode dever-se à ação no terminal nervoso, na fenda sináptica ou na membrana pós-sináptica, com conseqüente alteração no potencial de ação do nervo, na síntese, liberação ou hidrólise enzimática da acetilcolina, no efluxo de cálcio, ou mesmo por alteração no número e na sensibilidade dos receptores nicotínicos, além de poder causar bloqueio não-competitivo de canais iônicos. Esses fatores influenciam na farmacologia dos bloqueadores neuromusculares, aumentando ou diminuindo e prolongando ou encurtando o bloqueio neuromuscular <sup>6,15,20, 23-26</sup>.

Entre esses fármacos, os anticonvulsivantes, muito utilizados no tratamento da epilepsia, transtorno bipolar, neuralgia trigeminal e neuropatia diabética <sup>8-12</sup>, podem por si só agir na junção neuromuscular, alterar ou mesmo não interferir nas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas dos bloqueadores neuromusculares <sup>13-19,25-34</sup>. Do ponto de vista farmacológico e clínico, a carbamazepina assemelha-se à fenitoína, porém com menos efeitos indesejáveis

e, embora eficaz e útil no tratamento de crises parciais complexas, é também empregada no tratamento de vários tipos de dor neuropática. Entre os efeitos adversos é freqüente a fraqueza muscular, que pode resultar da diminuição espontânea ou evocada na liberação quantal de acetilcolina<sup>9,32</sup>. Além disso, esses fármacos também atuam na membrana do terminal nervoso, de modo similar ao curare<sup>35</sup>. É um potente indutor de enzimas microsossomais hepáticas; por conseguinte, ocorrem muitas interações medicamentosas por acelerar o metabolismo de muitos fármacos, tais como anticoncepcionais orais, corticosteróides, fenitoína, varfarina e bloqueadores neuromusculares, sobretudo os aminoesteróides<sup>6,9,19,24-25</sup>. Embora a inibição dos canais de cálcio e dos receptores de glutamato esteja envolvida na ação de muitas drogas anticonvulsivantes, o principal mecanismo de ação da carbamazepina parece dever-se ao comprometimento da excitabilidade das membranas por meio de uma ação inibitória dos canais de sódio voltagem-dependentes que transportam a corrente para o interior da célula, necessária para a geração de um potencial de ação<sup>9,36</sup>.

O atracúrio, bloqueador neuromuscular não-despolarizante do grupo benzilisoquinoléinico, consiste em uma mistura racêmica de dez estereoisômeros. Apresenta metabolização plasmática, que inclui hidrólise por esterases inespecíficas e uma autodegradação denominada eliminação de Hofmann, pH e temperatura-dependentes, o que constituiu grande avanço pelo fato de sua degradação não ser afetada por disfunções orgânicas. O rocurônio é um bloqueador neuromuscular não-despolarizante, aminoesteróide e, ao contrário do observado para o atracúrio, seu término de ação depende principalmente dos processos de distribuição, captação hepática seguido de eliminação inalterado que é predominantemente biliar<sup>37</sup>.

Estudos anteriores<sup>38-39</sup>, utilizando preparações nervo-músculo *in vitro*, modelos animais *in vivo* e ensaios clínicos em humanos, mostraram que o bloqueio neuromuscular produzido por diferentes bloqueadores neuromusculares, como a d-tubocurarina, o vecurônio e o rocurônio, é potencializado pela administração aguda de vários fármacos anticonvulsivantes. A potencialização do bloqueio neuromuscular preexistente, ocasionada pela administração aguda do anticonvulsivante, pode ser atribuída ao fato de esses fármacos competirem com os bloqueadores neuromusculares, deslocando-os dos sítios de ligação nas proteínas plasmáticas com conseqüente aumento da fração livre ativa<sup>39</sup>. Outros mecanismos foram descritos na tentativa de esclarecer essa potencialização, tendo sido observado que algumas drogas antiepilépticas exercem efeitos bloqueadores pré e pós-juncional, estabilizadores de membrana neuronal, alterando o fluxo transmembrana de íons sódio, potássio e cálcio, além de reduzir a síntese e a liberação de acetilcolina<sup>7,39,40</sup>. Entretanto, estudos prévios têm demonstrado que à exceção do atracúrio e do mivacúrio, a potência e a duração de ação da maioria dos bloqueadores

neuromusculares são reduzidas em pacientes em uso crônico de anticonvulsivantes, como a carbamazepina e a fenitoína<sup>15,25-27,29,41</sup>.

Nesse estudo, nos dois tipos de experimentos, observou-se que a carbamazepina na concentração empregada não alterou de forma significativa a amplitude das respostas musculares, resultados contrários aos da literatura que mostraram efeitos depressores diretos da carbamazepina na junção neuromuscular<sup>33</sup>. Alderdice e Trommer<sup>33</sup> estudaram os efeitos de diferentes anticonvulsivantes na junção neuromuscular de sapo e observaram que, ao contrário do fenobarbital, a carbamazepina ocasionou diminuição na liberação do neurotransmissor com conseqüente diminuição na amplitude do potencial de placa terminal.

Os efeitos do atracúrio tanto em preparação *in vivo* como *in vitro* não foram influenciados pela carbamazepina. A influência de anticonvulsivantes no bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio é ainda controversa. Alguns autores observaram que pacientes tratados cronicamente com fenitoína e carbamazepina não apresentaram resistência ao atracúrio<sup>17,25,42</sup>, resultados contrários ao relatado por Tempelhoff e col.<sup>16</sup>, que descreveram menor duração de ação do atracúrio em pacientes epiléticos em uso de fenitoína e/ou carbamazepina. Os diferentes resultados observados podem ser atribuídos às metodologias empregadas e aos variados tempos de exposição às drogas anticonvulsivantes<sup>16,17,25,42</sup>.

Nesse estudo, o período de sete dias não foi suficiente para produzir indução enzimática, mas, de acordo com estudos anteriores, a explicação para o atracúrio não ter seus efeitos alterados por anticonvulsivantes não está relacionada com a alteração no metabolismo hepático, uma vez que sua metabolização é órgão-independente<sup>17,25,43</sup>.

Em relação aos resultados obtidos com o rocurônio *in vitro*, ao contrário dos experimentos *in vivo*, observou-se maior grau de bloqueio neuromuscular nas preparações de ratos tratados com carbamazepina em comparação com o obtido nos não-tratados, comportamento similar ao relatado na exposição aguda aos anticonvulsivantes<sup>39-40</sup>. Esses resultados diferentes dos da literatura podem ser explicados pelo fato de sete dias não terem sido suficientes para causar alterações na junção neuromuscular, assim como indução enzimática, capazes de ocasionar menor grau e menor duração de bloqueio neuromuscular produzido pelos bloqueadores neuromusculares, sobretudo os aminoesteróides.

Há evidências de que pacientes cronicamente tratados com anticonvulsivantes, apresentam menos sensibilidade aos bloqueadores neuromusculares aminoesteróides. Essa sensibilidade diminuída aos bloqueadores neuromusculares não está claramente estabelecida. A etiologia dessa interação parece ser multifatorial e alguns possíveis mecanismos podem estar envolvidos: indução enzimática com aumento do metabolismo hepático e *clearance*, aumentada inativação e eliminação dessas drogas; aumento na concentração de  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, resultando em maior li-

gação protéica, menor fração livre de drogas catiônicas e alteração na distribuição; menor sensibilidade do receptor à acetilcolina; proliferação de receptores na membrana muscular<sup>6,13,17,19,25,32,34,41,44-50</sup>.

A tentativa de correlacionar resultados obtidos *in vitro* com a clínica é tarefa difícil; por isso, os ensaios *in vivo* foram realizados, pois são mais apropriados ao estudo farmacológico de drogas, em que pesem as diferenças entre ensaios experimentais e clínicos.

Os resultados permitem concluir que o tempo de exposição à carbamazepina foi insuficiente para causar indução enzimática e/ou alterações que dificultassem os efeitos dos bloqueadores neuromusculares. Pode-se inferir, portanto, que tenha ocorrido uma interação aguda sinérgica entre a carbamazepina e o rocurônio, o que justifica o maior grau de bloqueio neuromuscular e a importância de se monitorar a transmissão neuromuscular quando do uso concomitante de bloqueadores neuromusculares e carbamazepina.

## ***In Vitro and In Vivo Neuromuscular Effects of Atracurium and Rocuronium in Rats Treated with Carbamazepine for Seven Days***

Caroline Coutinho de Barcelos, M.D.; Angélica de Fátima de Assunção Braga, TSA, M.D.; Franklin Sarmento da Silva Braga, M.D.; Gloria Braga Potério, TSA, M.D.; Samanta Cristina Antoniassi Fernandes, M.D.; Yoko Oshima Franco, M.D.; Léa Rodrigues Simioni, M.D.

### **INTRODUCTION**

Several drugs used in the pre or perioperative period can interfere with the neuromuscular transmission or with the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of neuromuscular blockers, decreasing or potentiating their effects. Among the drugs that could alter the effects of neuromuscular blockers are local anesthetics, inhalational anesthetics, aminoglycosides, anticonvulsants, antiarrhythmic agents, magnesium, lithium, calcium channel blockers and others<sup>1-7</sup>.

Anticonvulsants are widely used in the treatment of seizures, bipolar disorder and different forms of neuropathy and among those used more often are phenytoin, vigabatrin, carbamazepine, valproates, phenobarbital and lamotrigine<sup>8-12</sup>. The blockade of voltage-gated sodium channels represents the primary action of those agents. It reduces the electrical excitability of cell membranes necessary to generate an action potential<sup>10</sup>. Additionally, due to the inhibition of GABA transaminase, they potentiate the synaptic inhibition mediated by GABA<sup>8-10</sup>. It seems that the action of some

of those drugs occurs via a third mechanism, the inhibition of type L calcium channels and other subtypes of voltage-gated calcium channels<sup>8,10</sup>.

Carbamazepine, a derivative of tricyclic antidepressants, is effective in the treatment of partial complex seizures and it is also used in the treatment of different types of neuropathic pain including diabetic neuropathic pain<sup>11,12</sup>. Currently, it is one of the most used anticonvulsant agent and occasionally it is also useful in the treatment of manic-depressive disorder<sup>8</sup>. Although several studies have investigated the effects of anticonvulsants in the neuromuscular response and their interaction with neuromuscular blockers, the results are conflicting. Some studies have demonstrated that anticonvulsants modify the response to neuromuscular blockers, potentiating, decreasing, or not interfering with it<sup>13-19</sup>. Therefore, the study of those interactions can be interesting in the anesthetic practice or in critical patients. The present study was done in rats treated with carbamazepine for seven days (CBZ) and non-treated (CBZ<sub>st</sub>) rats and its objective was to evaluate, *in vitro* and *in vivo*: the effects of carbamazepine on the neuromuscular transmission and its influence on the neuromuscular blockade produced by atracurium and rocuronium; and determine the concentrations of cytochrome P450 and b5 reductase in hepatic microsomes.

### **METHODS**

This is an *in vitro* and *in vivo* experimental study and the procedures are in accordance with the ethical principles for animal experiments of the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) and were approved by the Ethics Commission on Animal Experiments of the Instituto de Biologia of the Universidade Estadual de Campinas. Male Wistar rats weighing 180 to 250 g, provided by the Biotério Central da Unicamp, Campinas (SP) were used in this study. Animals were treated with carbamazepine by gavage for seven days, they were kept in cages with controlled temperature and illumination (12 hours light and 12 hours darkness) and received water and food *ad libitum*.

#### **Study of the neuromuscular response**

For the *in vitro* study, the rat phrenic nerve-hemidiaphragm (FND) was used. Animals (n = 5) were sacrificed under anesthesia with urethane (1.2 mg.kg<sup>-1</sup>, intraperitoneal) on the eighth day and prepared according to the technique described by Bulbring<sup>21</sup>. The hemidiaphragms, along with the corresponding phrenic nerves, were removed and preserved in a bowl containing 40 mL of Tyrode's solution with the following in mM composition: NaCl 137; KCl 2.7; CaCl<sub>2</sub> 1.8; NaHCO<sub>3</sub> 11.9; MgCl<sub>2</sub> 0.25; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3; and glucose 11. The preparation was constantly aired with carbogen (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) and maintained at 37° C. The nerve was placed on platinum electrodes connected to a Grass 548 stimulator. The diaphragm was under constant tension (5 g), with its tendinous connected to a wire and that to an isometric Load



Cell BG50 GMS transducer and subjected to indirect stimulation of 0.1 Hz for 0.2 msec, and muscular responses were recorded in a Gould RS 3400 physiographer.

The technique proposed by Leeuwijn and Wolters<sup>22</sup> was used for the *in vitro* study. Rats were anesthetized with urethane (1.2 mg.kg<sup>-1</sup>), a tracheostomy was done and they were maintained in mechanical ventilation with a Hugo Basile respirator (mod. 7025) set to maintain a tidal volume of 1.2 mL.kg<sup>-1</sup> of body weight and respiratory rate of 70 bpm. After dissection and section of the tendon of the anterior tibialis muscle and the sciatic nerve, trepanation of the tibia was done in order to fix the inferior member to a cork base. The tendon of the anterior tibialis muscle was connected to an isometric transducer (BG 50g) and the transducer was connected to the physiographer (Gould RS 4300). The distal stump of the sciatic nerve was stimulated (Grass S48 stimulator) through electrodes connected to it, using supramaximal stimuli of 0.2 ms and 0.5 Hz. After recording the control response and the perfect status of the preparation was verified, atracurium and rocuronium were injected through the penial vein.

In the *in vitro* studies, the concentrations of atracurium and rocuronium used were 20 µg.mL<sup>-1</sup> and 4 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively; *in vivo*, 0.5 mg.kg<sup>-1</sup> and 0.6 mg.kg<sup>-1</sup>, respectively. The concentrations used were based on the degree of blockade produced by the drugs after obtaining the dose-response curve (not shown). Muscular responses were recorded before and every 15 minutes for 60 minutes after the administration of the study drug.

*In vitro* and *in vivo* the following parameters were evaluated: 1) amplitude of the muscular response in preparations of rats treated with carbamazepine; 2) the effect of atracurium and rocuronium on the muscular response in preparations of rats treated with carbamazepine (CBZ<sub>t</sub>) and not treated (CBZ<sub>st</sub>).

#### Determination of the concentration of cytochrome P450 and b5 reductase

To determine the concentration of cytochrome P450 and b5 reductase on hepatic microsomes, the livers of CBZ<sub>t</sub> rats (G2) used in *in vitro* and *in vivo* study of the muscular response were used. A control group – G1 (CBZ<sub>st</sub>, n = 5), was composed by rats that received only normal saline for seven days. The following procedure was undertaken: exposure of the liver through a ventral incision; with the aid of a catheter, 50 mL of normal saline without heparin were injected in the cardiac ventricle, until the liver became whitish, at which time it was removed and frozen in liquid nitrogen. Hepatic microsomes were isolated from individual livers. Tissues were homogenized by hand with a potassium phosphate buffer and centrifuged at 10,000 x g for 20 minutes (Beckman Avanti J-20 XPI centrifuge). The supernatant was separated and ultracentrifuged at 100,000 x g for 1 hour. Microsomes were stored in a freezer at -80°C for posterior determination of total proteins, in which the Bradford colorimetric method

(1976) was used with BSA as the standard. The specific concentrations of cytochrome P450 and b5 were determined using the concentration of b5 reduced by NADH (1 mM), and the concentration of P450 reduced by DTN (2 mM) and CO (carbon monoxide) as a ligand. A plate spectrophotometer (Biotek Powerwave 2) was used for the analysis. The concentration of cytochromes was calculated according to the Lambert-Beer formula (A/C.L.ε) and related to the concentration of total proteins in the microsome sample, in which:

A = delta absorbance

ε = specific absorbance: P450 = 91 / mM cm and b5 = 112 / mM cm;

L = optical path of the small vat, cm;

C = concentration of microsomal proteins (mg protein.mL<sup>-1</sup>).

Results are expressed as mean and standard deviation. The amplitude of the muscular response was compared before and 60 minutes after the administration of the drugs. The concentrations of P450 and b5 reductase obtained in liver rats treated with carbamazepine (CBZ<sub>t</sub>) were compared with those of the control group (normal saline, CBZ<sub>st</sub>). The Student's *t* test was used assuming a level of significance of 5% (α = 5%). The test power was calculated, obtaining β > 20% (power > 80%).

## RESULTS

### Muscular response

In the *in vitro* (rat phrenic nerve-hemidiaphragm) and *in vivo* (external sciatic-popliteal nerve - anterior tibialis muscle) preparations of rats exposed to carbamazepine (40 mg.kg<sup>-1</sup>) there were no significant changes in the amplitude of the muscular response to indirect stimulation (Figures 1 and 2).

*In vitro*, the neuromuscular blockade produced by atracurium in preparations of treated rats (CBZ<sub>t</sub>) was 70.0 ± 8.16%, which was not statistically different from that obtained (74.7 ± 5.05%) in preparations of untreated rats (CBZ<sub>st</sub>) (Figure 3). As for rocuronium, in CBZ<sub>t</sub> rats the neuromuscular blockade was of 85.3 ± 17.52% versus 59.7 ± 20.1% in CBZ<sub>st</sub> rats and this difference was statistically significant (p = 0.0003) (Figure 4).

In *in vivo* experiments, the neuromuscular blockade produced by atracurium in CBZ<sub>t</sub> rats was of 56.87 ± 9.73%, which was not statistically different than that produced in CBZ<sub>st</sub> rats (56.5 ± 12.0) (Figure 6).

In CBZ<sub>st</sub> rats, the neuromuscular blockade induced by rocuronium was 78.9 ± 18.39%, which was not statistically different than CBZ<sub>t</sub> rats (65.8 ± 6.92) (Figure 6).

### Concentration of cytochrome P450 and b5 reductase

The concentration of cytochrome P450 and b5 reductase in hepatic microsomes in both groups (CBZ<sub>t</sub> and CBZ<sub>st</sub>) was: CBZ<sub>st</sub> (0.43 and 0.45 nmol/mg of protein, respectively); CBZ<sub>t</sub> (0.39 and 0.37 nmol.mg<sup>-1</sup>, respectively), but this difference was not statistically significant (Figure 7).

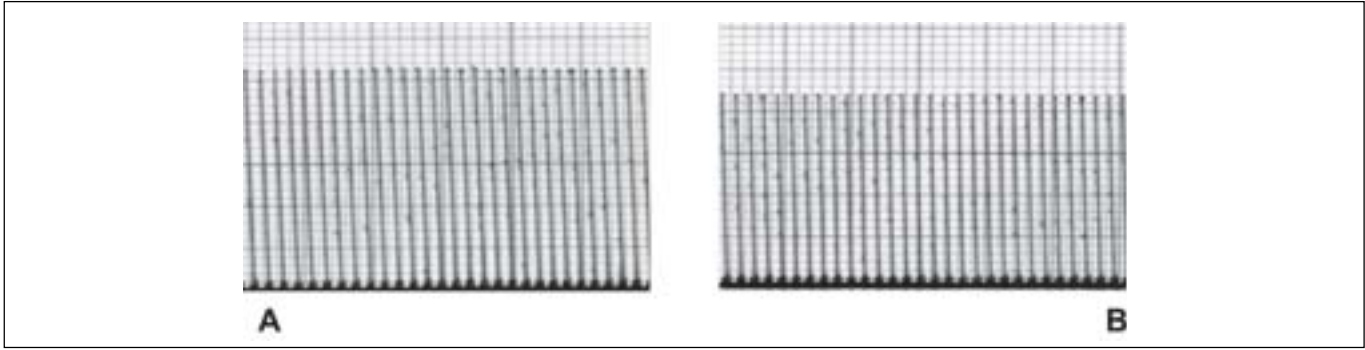


Figure 1 – Muscular Response to Indirect Stimulation in Phrenic Nerve-Diaphragm Preparations of Rats treated with Carbamazepine (40 mg.kg<sup>-1</sup>) for Seven Days.

A = beginning of stimulation; B = 60 minutes of stimulation.

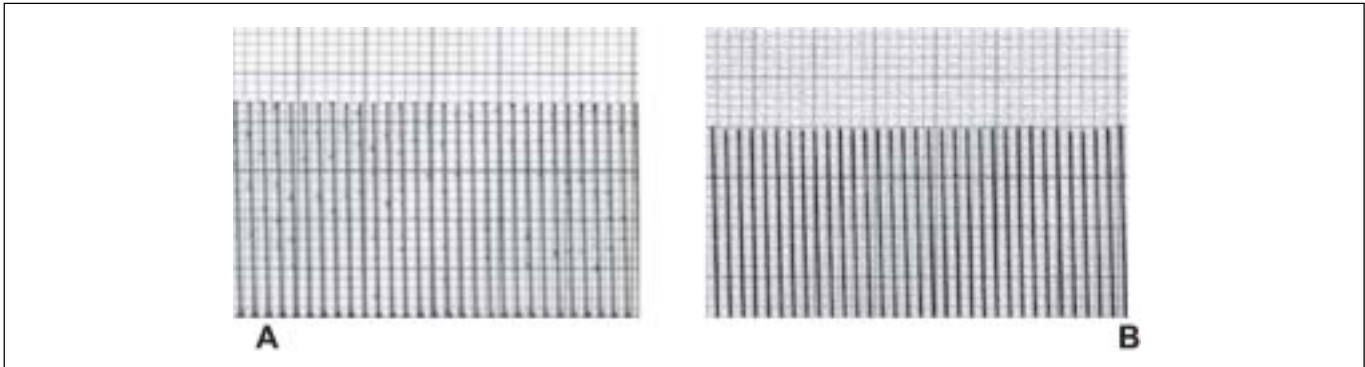


Figure 2 – Muscular Response to Indirect Stimulation in Sciatic Nerve-Anterior Tibialis Muscle of Rats Treated with Carbamazepine (40 mg.kg<sup>-1</sup>) for Seven Days.

A = beginning of stimulation; B = 60 minutes of stimulation.

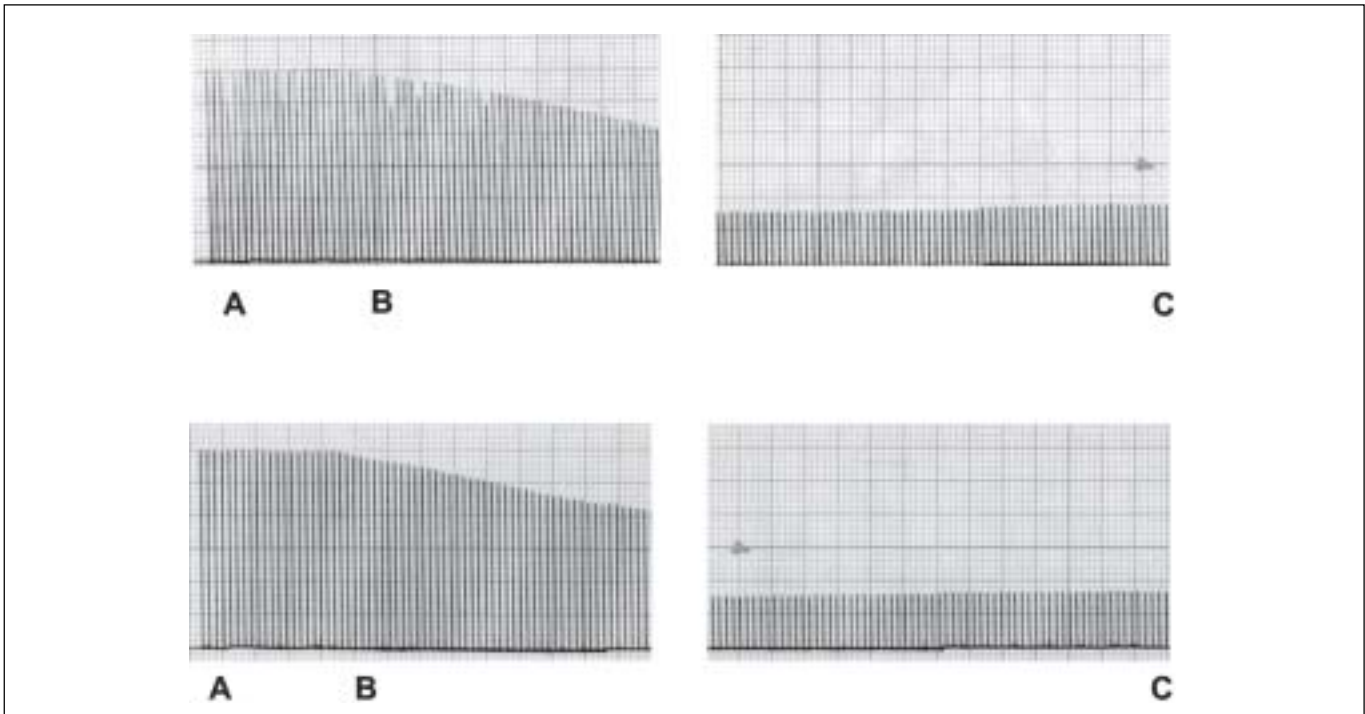


Figure 3 – Effects of Atracurium (20 µg.mL<sup>-1</sup>) on the Muscular Response to Indirect Stimulation of Phrenic Nerve-Diaphragm of Rats Treated (upper) and Not Treated with Carbamazepine (40 mg.kg<sup>-1</sup> - lower).

A = beginning of stimulation; B = addition of atracurium; C = 60 minutes of stimulation.

IN VITRO AND IN VIVO NEUROMUSCULAR EFFECTS OF ATRACURIUM AND ROCURONIUM IN RATS  
TREATED WITH CARBAMAZEPINE FOR SEVEN DAYS

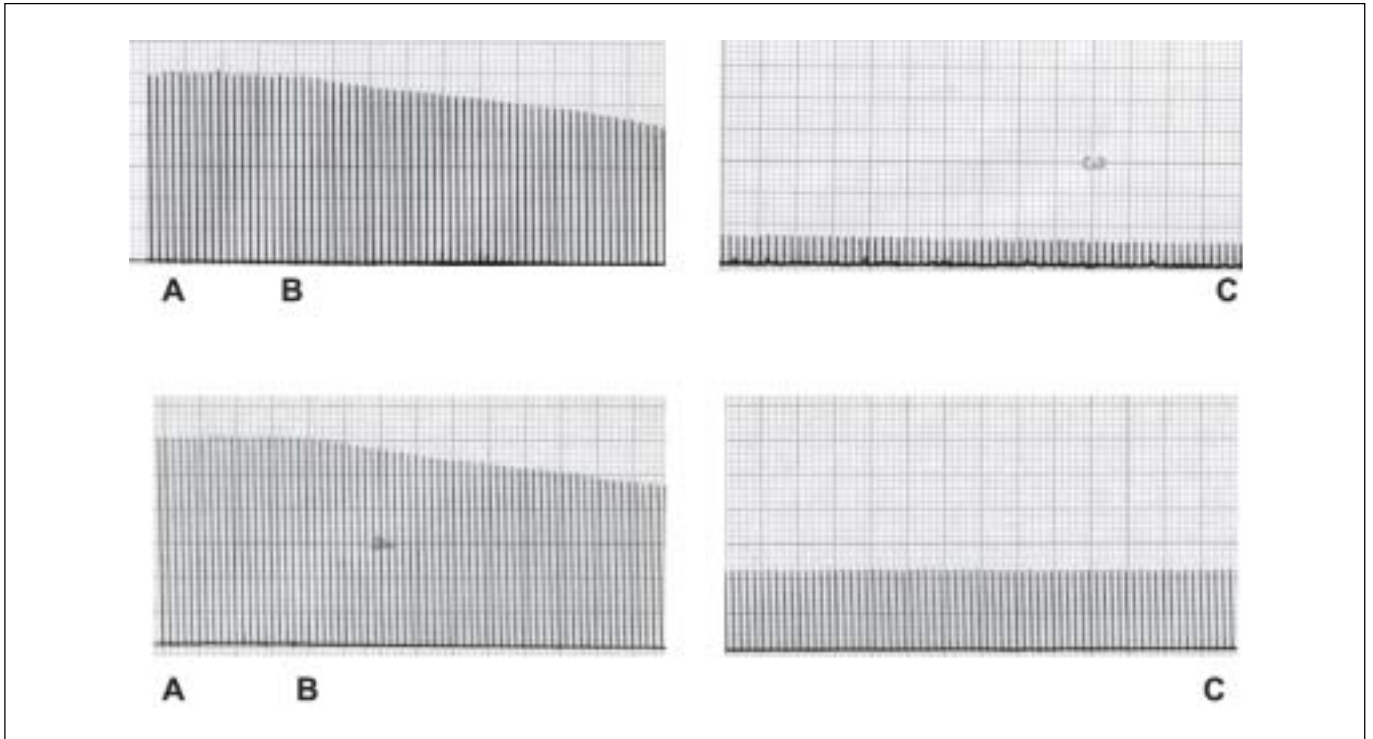


Figure 4 – Effects of Rocuronium ( $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) on the Muscular Response to Indirect Stimulation of Phrenic Nerve-Diaphragm Preparation of Rats Treated (upper) and Not-Treated with Carbamazepine ( $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  - lower).  
A = beginning of stimulation; B = addition of rocuronium; C = 60 minutes of stimulation.

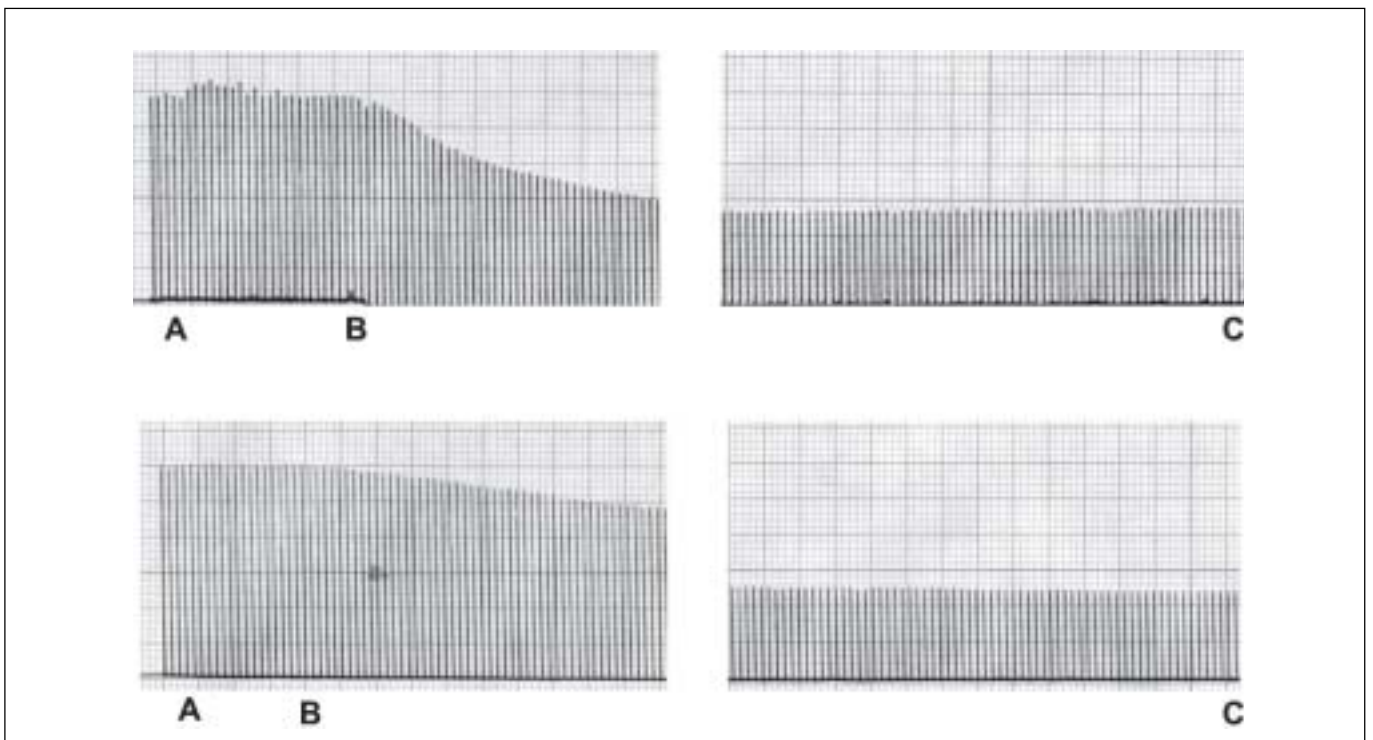


Figure 5 – Effects of Atracurium ( $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) on the Neuromuscular Response to Indirect Stimulation in External Sciatic-Popliteal Nerve-Anterior Tibialis Muscle of Rats Treated (upper) and Not-treated with Carbamazepine ( $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  - lower).  
A = beginning stimulation; B = injection of atracurium; C = 60 minutes of stimulation.

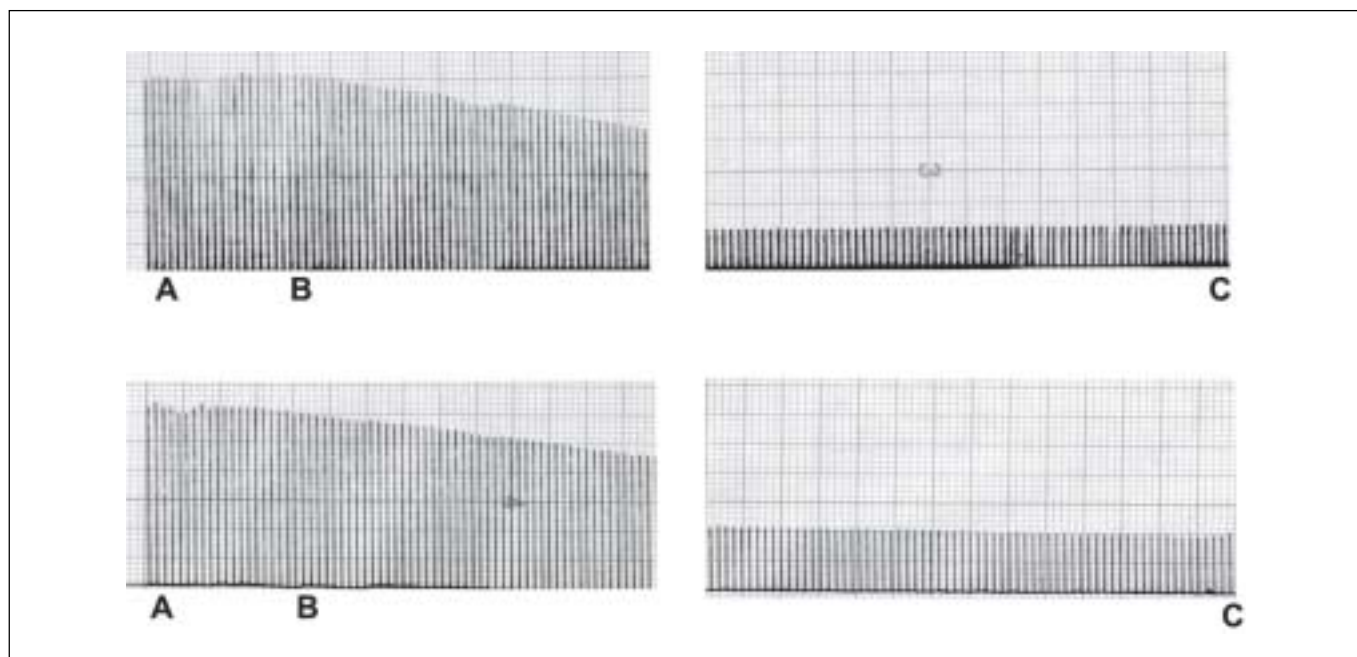


Figure 6 – Effects of Rocuronium ( $0.6 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) on the Muscular Response to Indirect Stimulation in External Sciatic-Popliteal Nerve-Anterior Tibialis Muscle of Rats treated (upper) and Not-treated with Carbamazepine ( $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  - lower). A = beginning of stimulation; B = injection of rocuronium; C = 60 minutes of stimulation.

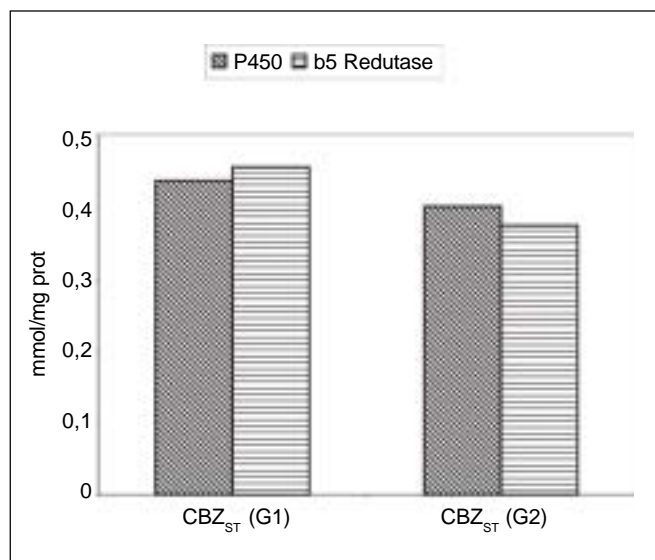


Figure 7 – Concentration of Cytochromes P450 and b5 Reductase in Rat Microsomes. In CBZ<sub>st</sub> (G1) – normal saline; CBZ<sub>st</sub> (G2) – treatment with carbamazepine ( $40 \text{ mg.kg}^{-1}$ ).

## DISCUSSION

There is evidence that the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of neuromuscular blockers can be modified by factors such as age, acid-basic status, temperature, different pathologies (burns, disorders of the upper

and inferior neurons), and drugs <sup>1,6,7</sup>. Among the drugs used in the pre or perioperative period, some can interfere, or not, in neuromuscular transmission potentiating or attenuating the effects of neuromuscular blockers.

Changes in the response to those drugs can be secondary to changes in distribution, metabolism and elimination, as well as at the level of the neuromuscular junction proximal to the central nervous system or in the muscular membrane. In the neuromuscular junction, the interaction can be due to their action on the nerve ending, in the synaptic cleft, or in the post-synaptic membrane, with consequent change in the action potential of the nerve, synthesis, release or enzymatic hydrolysis of acetylcholine, calcium efflux or even due to changes in the number and sensitivity of nicotinic receptors besides being able to cause non-competitive blockade of ion channels. Those factors influence the pharmacology of neuromuscular blockers increasing or decreasing and prolonging or shortening the muscular blockade <sup>6,15,20,23-26</sup>.

Among those drugs, anticonvulsants, widely used in the treatment of seizures, bipolar disorder, trigeminal neuralgia and diabetic neuropathy <sup>8-12</sup> can, by themselves, interfere with the neuromuscular junction, change, or not interfering at all with the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of neuromuscular blockers <sup>13-19,25-34</sup>. Pharmacologic and clinically, carbamazepine is similar to phenytoin, but with fewer undesirable effects and, although effective and useful in the treatment of partial complex seizures, it is also used in the treatment of several types of neuropathic pain. Among the adverse effects, muscular weakness which might result in

spontaneous or evoked reduction in the quantal release of acetylcholine<sup>9,32</sup> is frequent. Additionally, those drugs also affect the membrane of the nerve ending in a manner similar to curare<sup>35</sup>. It is a potent inducer of hepatic microsomal enzymes and consequently it has important drug interaction by accelerating the metabolism of several drugs such as oral contraceptives, corticosteroids, phenytoin, warfarin and neuromuscular blockers especially the aminosteroids<sup>6,9,19,24,25</sup>. Although the inhibition of calcium channels and glutamate receptors is involved in the effects of several anticonvulsants the main mechanism of action of carbamazepine seems to be due to changes in membrane excitability through the inhibition of voltage-gated sodium channels that transport the current to the interior of the cell which is necessary for the generation of an action potential<sup>9,36</sup>.

Atracurium, a benzylisoquinoline non-depolarizing neuromuscular blocker is a racemic mixture of ten isomers. It is metabolized in the plasma which includes hydrolysis by specific esterases and a self-degradation known as Hofmann elimination, pH and temperature-dependent, constituting a huge advance because its degradation is not affected by organic dysfunction. Rocuronium is an aminosteroid non-depolarizing neuromuscular blocker and contrary to atracurium the end of its action depends, mainly, on distribution, hepatic uptake and elimination mainly biliary of the unaltered drug<sup>37</sup>.

Prior studies<sup>38-39</sup> using *in vitro* nerve-muscle preparations, *in vivo* animal models and clinical assays in humans demonstrated that the neuromuscular blockade produced by different neuromuscular blockers, such as d-tubocurarine, vecuronium and rocuronium is potentiated by the acute administration of several anticonvulsants. Potentiation of pre-existing neuromuscular blockade secondary to the acute administration of anticonvulsants can be attributed to the competition between those drugs and neuromuscular blockers, dislocating them from their binding sites in plasma proteins, with the consequent increase in the active free fraction<sup>39</sup>. Other mechanisms have been described in an attempt to explain this potentiation and it was observed that some anticonvulsants have pre and post-junctional blocking effects, stabilize the neuronal membrane, altering the transmembrane flow of sodium, potassium and calcium besides reducing the synthesis and release of acetylcholine<sup>7,39,40</sup>. However, other studies have demonstrated that except for atracurium and mivacurium the potency and duration of action of most neuromuscular blockers are reduced in patients in chronic use of anticonvulsants, such as carbamazepine and phenytoin<sup>15,25-27,29,41</sup>.

In the present study it was observed in both experiments that the concentration of carbamazepine used did not cause significant changes in the amplitude of the muscular responses, conflicting with other studies that have reported direct depressor effects of carbamazepine in the neuromuscular junction<sup>33</sup>. Aldernice and Trommer<sup>33</sup> evaluated the direct effects of different anticonvulsants on the frog neuromuscu-

lar junction and observed that contrary to phenobarbital, carbamazepine decreased the releasing of neurotransmitter with the consequent reduction in the amplitude of the endplate potential.

The effects of atracurium both *in vivo* and *in vitro* were not influenced by carbamazepine. The influence of anticonvulsants in the neuromuscular blockade produced by atracurium is controversial. Some authors observed that patients in chronic treatment with phenytoin and carbamazepine did not show resistance to atracurium<sup>17,25,42</sup> contrary to the results reported by Tempelhoff et al.<sup>16</sup> who reported a shorter duration of action of atracurium in epileptic patients treated with phenytoin and/or carbamazepine. The opposing results observed can be attributed to the methodologies used and different times of exposure to the anticonvulsants<sup>16,17,25,42</sup>.

In the present study, the period of seven days was not enough to produce enzymatic induction but, according to prior studies, the fact that the effects of atracurium are not influenced by anticonvulsants is not related with changes in hepatic metabolism since their metabolism is organ-independent<sup>17,25,43</sup>.

As for rocuronium, contrary to the *in vivo* experiments, *in vitro* promoted a greater degree of muscular blockade in preparations of rats treated with carbamazepine when compared to that obtained in non-treated rats, which is similar to the behavior reported after the acute exposure to anticonvulsants<sup>39,40</sup>. Those results, which are different than the results reported in the literature, can be explained by the fact that seven days were not enough to cause changes in the neuromuscular junction and enzymatic induction capable of reducing the degree and duration of the neuromuscular blockade produced by neuromuscular blockers, especially the aminosteroids.

There is evidence that the sensitivity to aminosteroid neuromuscular blockers in patients in chronic treatment with anticonvulsants is decreased. This reduced sensitivity to neuromuscular blockers is not clearly established. The etiology of this interaction seems to be multifactorial and the mechanisms most likely to be involved are: enzymatic induction, with an increase in hepatic metabolism and clearance, increased inactivation and elimination of those drugs; increased concentration of acid  $\alpha_1$ -glycoprotein, resulting in greater protein binding, reduced fraction of free cationic drugs and change in distribution; reduced sensitivity of the receptor to acetylcholine; proliferation of receptors in the muscular membrane<sup>6,13,17,19,25,32,34,41,44-50</sup>.

The attempt to correlate the *in vitro* results with clinical practice is a difficult task and for this reason *in vivo* assays, more appropriate in the pharmacological study of drugs, were undertaken.

The results allow the conclusion that the time of exposure to carbamazepine was not sufficient to cause enzymatic induction and/or changes that hindered the effects of neuromuscular blockers. Therefore, one can infer that there was an acute interaction between carbamazepine and rocuronium.

nium, justifying the greater degree of neuromuscular blockade, demonstrating the importance of monitoring neuromuscular transmission when neuromuscular blockers and carbamazepine are used concomitantly.

#### REFERÊNCIAS – REFERENCES

01. Martins RS, Martins ALC — Bloqueadores Neuromusculares, em: Manica J — Anestesiologia: Princípios e Técnicas. Porto Alegre, Artes Médicas, 1997;308-331.
02. Miranda FG, Marín JS, Aránó JA — Neurofisiologia de la Union Neuromuscular, em: Gómez JAA, Miranda FG, Bozzo RB — Relajantes Musculares em Anestesia y Terapia Intensiva. Madrid, Aran, 2000;61-70.
03. Cardoso LSM, Martins CR, Tardelli MA — Efeitos da lidocaína por via venosa sobre a farmacodinâmica do rocurônio. Rev Bras Anestesiol, 2005;55:371-380.
04. Loyola YCS, Braga AFA, Potério GMB et al. — Influência da lidocaína no bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio. Estudo em preparação nervo frênico — diafragma de rato. Rev Bras Anestesiol, 2006;56:147-156.
05. Sousa SRS, Braga AFA, Potério GMB et al. — Influência da nifedipina no bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e pelo cisatracúrio. Estudo em preparações nervo frênico—diafragma de rato. Rev Bras Anestesiol, 2006;56:157-167.
06. Haywood PT, Divekar N, Karalliedde LD — Concurrent medication and the neuromuscular junction. Eur J Anaesthesiol, 1999;16:77-91.
07. Spacek A, Kress HG — Drug interactions with muscle relaxants. Acta Anaesthesiol Scand, 1998;42(Suppl 112):236-238.
08. Mei PA, Montenegro MA, Guerreiro MM et al. — Pharmacovigilance in epileptic patients using antiepileptic drugs. Arq Neuropsiquiatr, 2006;64:198-201.
09. Rang HP, Dale MM, Ritter JM et al. — Fármacos Antiepilépticos, em: Rang HP, Dale MM, Ritter JM et al. — Farmacologia. 5ª Ed. Rio de Janeiro, Churchill Livingstone Elsevier, 2003;627-639.
10. Perucca E — An introduction to antiepileptic drugs. Epilepsia, 2005;46:31-37.
11. Beydoun S, Alarcón F, Mangat S et al. — Long-term safety and tolerability of carbamazepine in painful diabetic neuropathy. Acta Neurol Scand, 2007;115:284-288.
12. Eisenberg E, River Y, Shifrin A et al. — Antiepileptic drugs in the treatment of neuropathic pain. Drugs, 2007;67:1265-1289.
13. Alloul K, Whalley DG, Shutway F et al. — Pharmacokinetic origin of carbamazepine-induced resistance to vecuronium neuromuscular blockade in anesthetized patients. Anesthesiology, 1996;84:330-339.
14. Nguyen A, Ramzan I — In vitro response of neuromuscular blockers after chronic carbamazepine treatment in rats. Pharmazie, 2000;55:957.
15. Richard A, Girard F, Girard DC et al. — Cisatracurium-induced neuromuscular blockade is affected by chronic phenytoin or carbamazepine treatment in neurosurgical patients. Anesth Analg, 2005;100:538-544.
16. Tempelhoff R, Modica PA, Jellish WS et al. — Resistance to atracurium-induced neuromuscular blockade in patients with intractable seizure disorders treated with anticonvulsants. Anesth Analg, 1990;71:665-669.
17. Spacek A, Neiger FX, Spiss CK et al. — Atracurium-induced neuromuscular block is not affected by chronic anticonvulsant therapy with carbamazepine. Acta Anaesthesiol Scand, 1997;41:1308-1311.
18. Spacek A, Nickl S, Neiger FX et al. — Augmentation of the rocuronium-induced neuromuscular block by the acutely administered phenytoin. Anesthesiology, 1999;90:1551-1555.
19. Spacek A, Neiger FX, Krenn CG et al. — Rocuronium-induced neuromuscular block is affected by chronic carbamazepine therapy. Anesthesiology, 1999;90:109-112.
20. Kim JU, Lee YK, Lee YM et al. — The effect of phenytoin on rocuronium-induced neuromuscular block in the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation. J Neurosurg Anesthesiol, 2005;17:149-152.
21. Bulbring E — Observation on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. Br J Pharmacol, 1946;1:38-61.
22. Leeuwijn RS, Wolters ECMJ — Effects of corticosteroids on the sciatic nerve-tibialis anterior muscle of rats treated with hemicholinium-3. Neurology, 1977;27:171-177.
23. Ostergaard D, Engbaek J, Viby-Mogensen J — Adverse reactions and interactions of the neuromuscular blocking drugs. Med Toxicol Adverse Drug Exp, 1989;4:351-368.
24. Anderson GD — A mechanistic approach to antiepileptic drug interactions. Ann Pharmacother, 1998;32:554-563.
25. Ornstein E, Matteo RS, Schwartz AE et al. — The effect of phenytoin on the magnitude and duration of neuromuscular block following atracurium or vecuronium. Anesthesiology, 1987;67:191-196.
26. Ornstein E, Matteo RS, Weinstein JA et al. — Accelerated recovery from doxacurium-induced neuromuscular blockade in patients receiving chronic anticonvulsant therapy. J Clin Anesth, 1991;3:108-111.
27. Whalley DG, Ebrahim Z — Influence of carbamazepine on the dose-response relationship of vecuronium. Br J Anaesth, 1994;72:125-126.
28. Norman J — Resistance to vecuronium. Anaesthesia, 1993;48:1068-1069.
29. Roth S, Ebrahim ZY — Resistance to pancuronium in patients receiving carbamazepine. Anesthesiology, 1987;66:691-693.
30. Jellish WS, Modica PA, Tempelhoff R — Accelerated recovery from pipecuronium in patients treated with chronic anticonvulsant therapy. J Clin Anesth, 1993;5:105-108.
31. Jellish WS, Thalji Z, Brundidge PK et al. — Recovery from mivacurium-induced neuromuscular blockade is not affected by anticonvulsant therapy. J Neurosurg Anesthesiol, 1996;8:4-8.
32. Brodie MJ, Dichter MA — Antiepileptic drugs. N Engl J Med, 1996;334:168-175.
33. Alderdice MT, Trommer BA — Differential effects of the anticonvulsants phenobarbital, ethosuximide and carbamazepine on neuromuscular transmission. J Pharmacol Exp Ther, 1980;215:92-96.
34. Platt PR, Thackray NM — Phenytoin-induced resistance to vecuronium. Anaesth Intensive Care, 1993;21:185-191.
35. Hartman GS, Fiamengo SA, Riker WF Jr. — Succinylcholine: mechanism of fasciculations and their prevention by d-tubocurarine or diphenylhydantoin. Anesthesiology, 1986;65:405-413.
36. Kohling R — Voltage-gated sodium channels in epilepsy. Epilepsia, 2002;43:1278-1295.
37. Stoelting RK, Hillier SC — Neuromuscular blocking drugs, em: Stoelting RK, Hillier SC — Pharmacology & Physiology in Anesthetic Practice. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2006; 208-250.
38. Norris FH Jr, Colella J, Mcfarlin D — Effect of diphenylhydantoin on neuromuscular synapse. Neurology, 1964;14:869-876.
39. Gray HS, Slater RM, Pollard BJ — The effect of acutely administered phenytoin on vecuronium-induced neuromuscular blockade. Anaesthesia, 1989;44:379-381.
40. Nguyen A, Ramzan I — Acute in vitro neuromuscular effects of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide. Anesth Analg, 1997;84:886-890.
41. Soriano SG, Sullivan LJ, Venkatakrishnan K et al. — Pharmacokinetics and pharmacodynamics of vecuronium in children



receiving phenytoin or carbamazepine for chronic anticonvulsant therapy. *Br J Anaesth*, 2001;86:223-229.

42. Ebrahim ZY, Bulkey R, Roth S — Carbamazepine therapy and neuromuscular blockade with atracurium or vecuronium. *Anesth Analg*, 1988;67:S55.
43. Fisher DM, Canfell PC, Fahey MR et al. — Elimination of atracurium in humans: contribution of Hofmann elimination and ester hydrolysis versus organ-based elimination. *Anesthesiology*, 1986;65:6-12.
44. Loan PB, Connolly FM, Mirakhur RK et al. — Neuromuscular effects of rocuronium in patients receiving beta-adrenoreceptor blocking, calcium entry blocking and anticonvulsant drugs. *Br J Anaesth*, 1997;78:90-91.
45. Kim CS, Arnold FJ, Itani MS et al. — Decreased sensitivity to metocurine during long-term phenytoin therapy may be attributable to protein binding and acetylcholine receptor changes. *Anesthesiology*, 1992;77:500-506.
46. Kremer JM, Wilting J, Janssen LH — Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Ver*, 1988;40:1-47.
47. Martyn JA, Abernethy DR, Greenblatt DJ — Plasma protein binding of drugs after severe burn injury. *Clin Pharmacol Ther*, 1984;35:535-539.
48. Wood M — Plasma binding and limitation of drug access to site of action. *Anesthesiology*, 1991;75:721-723.
49. Hans P, Brichant JF, Pieron F et al. — Elevated plasma alpha<sub>1</sub>-acid glycoprotein levels: lack of connection to resistance to vecuronium blockade induced by anticonvulsant therapy. *J Neurosurg Anesthesiol*, 1997;9:3-7.
50. Pirttiaho HI, Sotaniemi EA, Pelkonen RO et al. — Hepatic blood flow and drug metabolism in patients on enzyme-inducing anticonvulsants. *Eur J Clin Pharmacol*, 1982;22:441-445.

## RESUMEN

Barcelos CC, Braga AFA, Braga FSS, Potério GB, Fernandes SCA, Franco YO, Simioni LR — Efectos Neuromusculares *In Vitro* e *In Vivo* del Atracurio y del Rocuronio en Ratonos Sometidos a Tratamiento de Siete Días con Carbamazepina.

**JUSTIFICATIVA Y OBJETIVOS:** *Se trata de un estudio experimental que investigó in vitro e in vivo el bloqueo neuromuscular producido por el rocuronio y atracurio en ratones tratados con carbamazepina y determinó las concentraciones de citocromo P450 y b5 reductasis en microsomas hepáticos.*

**MÉTODO:** *Ratones fueron tratados por siete días con carbamazepina (CBZ) — 40 mg.kg<sup>-1</sup> a través de una sonda y sacrificados al octavo día bajo anestesia con uretana. Las preparaciones in vitro e in vivo fueron montadas de acuerdo con las técnicas de Bulbring y de Leeuwin y Wolters, respectivamente. Las concentraciones y dosis utilizadas de los bloqueadores en las preparaciones in vitro e in vivo fueron, respectivamente, 20 µg.mL<sup>-1</sup> y 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> para atracurio (ATC); 4 µg.mL<sup>-1</sup> y 0,6 mg.kg<sup>-1</sup> para rocuronio (ROC). Cada protocolo tuvo un n = 5 y las respuestas fueron observadas por 60 minutos. Los efectos del ATC y ROC fueron evaluados en las preparaciones de ratones tratados (Cbz<sub>i</sub>) y comparados a los observados en los de ratones no tratados (CBZ<sub>st</sub>). Las concentraciones de citocromo P450 y b5 reductasis fueron determinadas en microsomas aislados de hígados de ratones tratados (CBZ<sub>i</sub>) y comparadas con las obtenidas en ratones no tratados (CBZ<sub>st</sub>).*

**RESULTADOS:** *La carbamazepina no alteró la amplitud de las respuestas musculares; in vitro y in vivo, no hubo diferencia entre el bloqueo neuromuscular producido por el atracurio en las preparaciones CBZ<sub>i</sub> versus CBZ<sub>st</sub>; el bloqueo neuromuscular producido por el Rocuronio en las preparaciones CBZ<sub>i</sub> fue potenciado in vitro. La carbamazepina no alteró las concentraciones de citocromo P450 y b5.*

**CONCLUSIONES:** *El tratamiento por siete días con carbamazepina, no influenció en el bloqueo producido por el atracurio, y alteró in vitro los efectos del rocuronio. El tiempo de tratamiento no fue suficiente para causar la inducción enzimática y disminuir la sensibilidad al rocuronio.*