



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito da associação ropivacaína-pancurônio na transmissão neuromuscular e eficácia da neostigmine e 4-aminopiridina na reversão do bloqueio: estudo experimental[☆]



Angélica de Fátima Braga^{a,*}, Vanessa Henriques Carvalho^b,
Franklin Sarmiento Braga^a, Gloria Maria Braga Potério^a
e Filipe Nadir Caparica Santos^a

^a Departamento de Anestesiologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^b Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Recebido em 11 de setembro de 2013; aceito em 31 de outubro de 2013

Disponível na Internet em 8 de novembro de 2014

PALAVRAS-CHAVE

Anestésicos Locais,
Ropivacaína;
Bloqueadores
neuromusculares;
Não despolarizantes,
Pancurônio;
Animais, Ratos

Resumo

Justificativa e objetivos: Os efeitos dos anestésicos locais na junção neuromuscular e sua influência no bloqueio produzido por bloqueadores neuromusculares não-despolarizantes é ainda alvo de pouca investigação, no entanto esta interação tem sido descrita em trabalhos experimentais e em humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro, a interação da ropivacaína com o pancurônio, a influência na transmissão e bloqueio neuromuscular e a efetividade da neostigmina e 4-aminopiridina na reversão do bloqueio.

Método: Ratos foram distribuídos em grupos (n=5) de acordo com o fármaco estudado: ropivacaína (5 µg mL⁻¹); pancurônio (2 µg mL⁻¹); ropivacaína + pancurônio. A neostigmina e a 4-aminopiridina foram usadas nas concentrações de 2 µg mL⁻¹ e 20 µg mL⁻¹, respectivamente. Avaliou-se: 1) efeitos da ropivacaína sobre o potencial de membrana e potenciais de placa terminal em miniatura; 2) a amplitude das respostas do diafragma antes e 60 minutos após a adição da ropivacaína; o grau de bloqueio neuromuscular com o pancurônio e com a associação pancurônio - ropivacaína; 3) a efetividade da neostigmina e 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular.

Resultados: A ropivacaína não alterou a amplitude das respostas musculares, os potenciais de membrana, mas diminuiu a frequência e a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura. O bloqueio produzido pelo pancurônio foi potencializado pela ropivacaína, e parcial e totalmente revertido pela neostigmina e 4-aminopiridina, respectivamente.

[☆] Pesquisa conduzida no Departamento de Anestesiologia e Farmacologia, Escola de Medicina, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: franklinbraga@terra.com.br (A.F. Braga).

Conclusões: A ropivacaína potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio. O antagonismo completo com a 4-aminopiridina sugere ação pré-sináptica da ropivacaína.
© 2014 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

KEYWORDS

Local anesthetics, ropivacaine; Neuromuscular blockers; Nondepolarising, pancuronium; Animals, rats

Effect of ropivacaine combined with pancuronium on neuromuscular transmission and effectiveness of neostigmine and 4-aminopyridine for blockade reversal: experimental study

Abstract

Background and objectives: The local anesthetic effects on neuromuscular junction and its influence on blockade produced by nondepolarizing neuromuscular blockers are still under-investigated; however, this interaction has been described in experimental studies and in humans. The aim of this study was to evaluate *in vitro* the interaction between ropivacaine and pancuronium, the influence on transmission and neuromuscular blockade, and the effectiveness of neostigmine and 4-aminopyridine to reverse the blockade.

Methods: Rats were divided into groups (n=5) according to the study drug: ropivacaine ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$); pancuronium ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$); ropivacaine + pancuronium. Neostigmine and 4-aminopyridine were used at concentrations of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The effects of ropivacaine on membrane potential and miniature end-plate potential, the amplitude of diaphragm responses before and 60 minutes after the addition of ropivacaine (degree of neuromuscular blockade with pancuronium and with the association of pancuronium-ropivacaine), and the effectiveness of neostigmine and 4-aminopyridine on neuromuscular block reversal were evaluated.

Results: Ropivacaine did not alter the amplitude of muscle response (the membrane potential), but decreased the frequency and amplitude of the miniature end-plate potential. Pancuronium blockade was potentiated by ropivacaine, and partially and fully reversed by neostigmine and 4-aminopyridine, respectively.

Conclusions: Ropivacaine increased the neuromuscular block produced by pancuronium. The complete antagonism with 4-aminopyridine suggests presynaptic action of ropivacaine.

© 2014 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

Os anestésicos locais, particularmente as amino-amidas, constituem um grupo de fármacos amplamente utilizados por diferentes vias de administração, tais como: tópica, infiltração subcutânea, bloqueio de nervos periféricos, anestesia neuroaxial isolada ou associada à anestesia geral.¹⁻⁴

Existem evidências de que estes fármacos podem interferir na transmissão neuromuscular e potencializar os efeitos dos bloqueadores neuromusculares.¹⁻⁷

A ropivacaína é um anestésico local amino-amida com propriedades físico-químicas semelhantes à bupivacaína (S50%-R50%), excetuando a menor potência e o menor grau de bloqueio motor, com maior seletividade por fibras nervosas sensitivas, características atribuídas à menor lipossolubilidade e à sua estrutura de isômero puro S⁻ em oposição à mistura racêmica da bupivacaína.^{8,9}

Estas características também são responsáveis pela menor toxicidade cardíaca e do sistema nervoso central, vantagens apresentadas pela ropivacaína sobre a bupivacaína (S50%-R50%).^{8,9} O pancurônio é um bloqueador neuromuscular não despolarizante, aminoesteróide e de longa duração, fato que justifica seu uso em cirurgias prolongadas e em terapia intensiva.¹⁰

O objetivo deste estudo foi avaliar, em modelo experimental, o efeito da ropivacaína na transmissão neuromuscular, a sua influência no bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio e a eficácia da neostigmine e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio.

Método

Trata-se de estudo experimental *in vitro*, estando os procedimentos usados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (protocolo n° 2346-1).

Foram utilizados ratos machos de linhagem Wistar, com peso entre 180-250 g. Os animais foram anestesiados com uretana ($1,2 \text{ mg kg}^{-1}$, via intraperitoneal), e em seguida foram exsanguinados por secção dos vasos do pescoço, para facilitar a identificação e retirada do hemidiafragma esquerdo e a porção do nervo frênico correspondente. Para avaliação do efeito da ropivacaína sobre a transmissão neuromuscular, sua influência no bloqueio produzido

pelo pancurônio e a efetividade da neostigmine e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular foi utilizada a técnica descrita por Bulbring.¹¹ As preparações foram fixadas em cuba contendo 40 mL de solução nutritiva de Tyrode, aeradas constantemente com carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂) e mantidas 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 (5,0 g), através de fio ligado a transdutor isométrico Load Cell BG50 GMS, e submetido à estimulação indireta de 0,1 Hz de frequência e duração de 0,2 m.seg, sendo que as variações de tensão produzidas pelas contrações do diafragma foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400. Para avaliar o efeito dos fármacos empregados isoladamente e associados na transmissão neuromuscular, foram formados três grupos (n=5): Grupo I – ropivacaína (5 µg.mL⁻¹); Grupo II – pancurônio (2 µg.mL⁻¹); e Grupo III – pancurônio (2 µg.mL⁻¹), em preparação previamente exposta à ropivacaína (5 µg.mL⁻¹). No Grupo III (ropivacaína-pancurônio), o pancurônio foi adicionado à preparação 30 minutos após a adição da ropivacaína. As respostas musculares à estimulação indireta foram registradas durante 60 minutos após a adição dos fármacos.

A mesma preparação foi utilizada para estudar a efetividade dos fármacos (neostigmine – 2 µg.mL⁻¹ e 4-aminopiridina – 20 µg.mL⁻¹) na reversão do bloqueio neuromuscular, que foram adicionadas à preparação após o bloqueio produzido pela associação ropivacaína-pancurônio. Também foram estudados, em diafragma de ratos, os efeitos da ropivacaína nos potenciais de placa terminal em miniatura e nos potenciais de membrana. Os parâmetros avaliados foram: 1) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 60 minutos após a adição de ropivacaína; 2) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 60 minutos após a adição do pancurônio isoladamente e em preparação previamente exposta à ropivacaína; 3) os potenciais de membrana (PM) e potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM); e 4) a efetividade da neostigmina e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular.

Os resultados foram expressos em médias e desvios-padrão. O teste de Wilcoxon foi empregado para análise do potencial de membrana das fibras musculares e efetividade dos fármacos reversores do bloqueio. Para avaliar a redução da amplitude das respostas musculares foi utilizado o *t* de Student (distribuição normal). Assumiu-se nível significativo de 5% ($p < 0,05$). O poder do teste foi calculado e obteve-se $\beta > 20\%$ (poder $> 80\%$).

Resultados

A ropivacaína na concentração estudada e empregada isoladamente não causou redução na amplitude das respostas musculares à estimulação elétrica indireta, em preparação nervo frênico-diafragma de rato. Com o pancurônio isoladamente e nas preparações previamente expostas à ropivacaína, as médias de amplitude das respostas musculares foram 45,1% e 6,2%, respectivamente, e o bloqueio correspondente foi de $54,9 \pm 14,1\%$ e $93,8 \pm 9,2\%$, respectivamente, com diferença significativa ($p = 0,015$) (figs. 1 e 2).

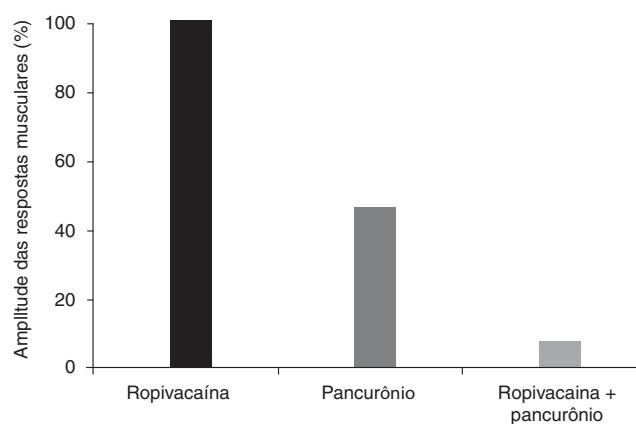


Figura 1 Amplitude das respostas musculares à estimulação indireta em preparação nervo frênico-diafragma de rato exposta à ropivacaína (5,0 µg.mL⁻¹), pancurônio (2 µg.mL⁻¹) e ropivacaína + pancurônio.

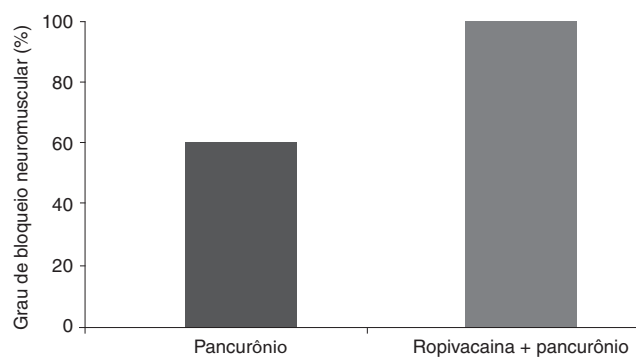


Figura 2 Grau de bloqueio com pancurônio isoladamente e em preparação previamente exposta à ropivacaína.

O bloqueio neuromuscular causado pelo pancurônio nas preparações expostas à ropivacaína foi revertido parcial e totalmente pela neostigmina e pela 4-aminopiridina, respectivamente.

Não foi observado efeito significativo da ropivacaína sobre os potenciais de membrana (fig. 3). Os efeitos sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) caracterizaram-se por diminuição na frequência e amplitude até bloqueio total.

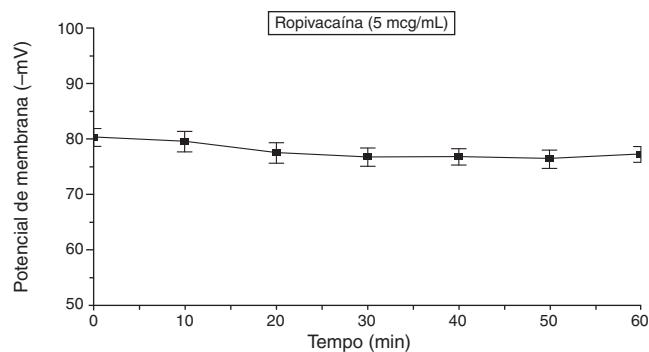


Figura 3 Efeito da ropivacaína (5,0 µg.mL⁻¹) no potencial de membrana em preparação diafragma de rato.

Discussão

Os efeitos dos anestésicos locais na junção neuromuscular e sua influência no bloqueio produzido por bloqueadores neuromusculares não despolarizantes é ainda alvo de pouca investigação; no entanto, esta interação tem sido descrita em trabalhos experimentais e em humanos.^{1-7,12} Estudos experimentais^{5-7,13} vem dando embasamento para os resultados observados na clínica, com a vantagem da possibilidade de eliminar um viés, que é a grande variabilidade individual de resposta aos bloqueadores neuromusculares.^{10,14}

Embora somente em altas doses os anestésicos locais possam produzir bloqueio neuromuscular, a interação com os bloqueadores neuromusculares, particularmente os não despolarizantes, torna-se clinicamente relevante, sendo necessária uma observação cuidadosa quando do emprego simultâneo desses agentes, ou em situações em que a margem de segurança da transmissão neuromuscular estiver reduzida.^{1-4,12,14,15}

São admitidos vários mecanismos para explicar a interação entre os anestésicos locais e os bloqueadores neuromusculares. Na região pré-sináptica, deprimem seletivamente a condução nas fibras motoras e inibem a liberação da acetilcolina durante a estimulação nervosa. Ao nível pós-sináptico, os anestésicos locais podem se ligar a diferentes sítios específicos de acetilcolina, resultando em dessensibilização de receptores, além de poder ocasionar oclusão temporária de canais dos receptores nicotínicos. Adicionalmente, são descritas uma ação estabilizadora da membrana pós-juncional e a interferência com o mecanismo de excitação-contração da fibra muscular.^{5-7,11,13,16-19}

A concentração de ropivacaína empregada foi estabelecida em projeto piloto e determinada a partir de dados apresentados em estudos realizados em nosso meio, onde foram utilizados outros anestésicos locais amino-amidas com características semelhantes à ropivacaína.^{6,7} Matsuo et al.,¹³ em preparação semelhante à utilizada neste estudo, avaliaram a associação de d-tubocurarina com diferentes anestésicos locais, e observaram que mesmo em concentrações ineficazes, os anestésicos locais potencializaram o bloqueador neuromuscular, evidenciado pela diminuição significativa da ED50. Em relação à influência dos bloqueadores neuromusculares nos efeitos dos anestésicos locais, estes autores também descreveram que concentrações ineficazes de d-tubocurarina causaram similar diminuição da ED50 e aumento na potência dos anestésicos locais.

Em ensaio clínico, Sahin et al.⁴ avaliaram as características do bloqueio neuromuscular produzido pelo vecurônio em pacientes submetidos à anestesia geral associada ao bloqueio epidural com levobupivacaína a 0,5% (15 mL), e observaram aumento significativo no índice de recuperação e duração total do efeito do vecurônio, sem, no entanto, influenciar na sua duração clínica (DC25%). Estes achados podem ser justificados pelo fato de o metabolismo da levobupivacaína, quando empregada no espaço epidural, só ocorrer em aproximadamente 30 minutos, quando o fármaco atinge a circulação.¹

O presente estudo mostrou que, na concentração estudada, a ropivacaína empregada isoladamente não exerceu efeitos na junção neuromuscular; no entanto, ela

potencializou o bloqueio produzido pelo pancurônio. Estes resultados assemelham-se aos de outros autores, que não observaram em trabalhos experimentais e clínicos prejuízo na transmissão neuromuscular, quando do emprego isolado de diferentes anestésicos locais. Entretanto, foi descrita evidente potencialização no efeito de vários bloqueadores neuromusculares como resultado da associação desses fármacos, interação que pode ser consequente à potencialização verdadeira em diferentes locais da junção neuromuscular,^{1,2,4-7,12,13,20} causada pela ação dos dois tipos de drogas.

Acredita-se que o maior bloqueio neuromuscular ocasionado pelo pancurônio nas preparações de diafragma de ratos previamente expostas à ropivacaína, e evidenciado por uma maior redução na amplitude das respostas musculares à estimulação do nervo frênico, seja devido a uma ação pré-sináptica da ropivacaína, e não à ação despolarizante na fibra muscular, visto que nos estudos eletrofisiológicos, observou-se que a ropivacaína na concentração empregada não alterou o potencial de membrana das fibras musculares. A ação pré-sináptica foi demonstrada pela diminuição na frequência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) ocasionada pela ropivacaína, sendo resultado de alteração na liberação quantal de acetilcolina.

O bloqueio neuromuscular ocasionado pela associação ropivacaína-pancurônio foi totalmente revertido com a 4-aminopiridina, e em menor proporção com a neostigmine. Esses resultados também foram descritos por Sahin et al.,⁴ que observaram, em humanos, maior eficácia da 4-aminopiridina em relação a neostigmine na reversão de bloqueio ocasionado pelo vecurônio em pacientes que receberam levobupivacaína no espaço peridural. Em trabalhos experimentais, resultados semelhantes foram encontrados na reversão do bloqueio resultante da associação lidocaína-rocuroônio.⁵

A neostigmine, ao inibir a acetilcolinesterase, aumenta a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica, sendo capaz de deslocar competitivamente os agentes causadores do bloqueio. O antagonismo parcial pela neostigmine reforça esse achado, uma vez que os anticolinesterásicos são eficazes apenas na reversão do bloqueio pós-sináptico. A 4-aminopiridina, além do efeito inibidor de dessensibilização de receptores nicotínicos da placa terminal, provoca aumento quantal de acetilcolina. Esse aumento é resultante de ações na membrana das terminações nervosas, como a inibição dos canais de potássio, que produz aumento na duração do potencial de ação, e o maior influxo de íons cálcio para as terminações nervosas motoras durante a despolarização da membrana.²¹⁻²³ O antagonismo completo obtido com a 4-aminopiridina sugeriu que a interação da ropivacaína com o pancurônio tem componente pré-sináptico relacionado à diminuição da liberação de acetilcolina.

A ropivacaína isoladamente não comprometeu a transmissão neuromuscular, mas potencializou o bloqueio produzido pelo pancurônio, que foi revertido pela neostigmina e 4-aminopiridina. Esses resultados são importantes para a prática clínica, no sentido de orientar quanto à necessidade do emprego de monitorização dos efeitos dos bloqueadores neuromusculares, particularmente quando do uso associado a outros fármacos.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Toft P, Kirkegaard Nielsen H, Severinsen I, et al. Effect of epidurally administered bupivacaine on atracurium-induced neuromuscular blockade. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1990;34:649–52.
2. Taivainen T, Meretoja OA, Rosenberg PH. The effect of epidural bupivacaine on vecuronium-induced neuromuscular blockade in children. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1994;38:453–6.
3. Suzuki T, Mizutani H, Ishikawa K, et al. Epidurally administered mepivacaine delays recovery of train-of-four ratio from vecuronium-induced neuromuscular block. *Br J Anaesth.* 2007;99:721–5.
4. Sahin SH, Colak A, Sezer A, et al. Effect of epidural levobupivacaine on recovery from vecuronium-induced neuromuscular block in patients undergoing lower abdominal surgery. *Anaesth Intensive Care.* 2011;39:607–10.
5. Loyola YC, Braga Ade F, Potério GM, et al. Influence of lidocaine on the neuromuscular block produced by rocuronium: study in rat phrenic-diaphragmatic nerve preparation. *Rev Bras Anesthesiol.* 2006;56:147–56.
6. Braga AF, Carvalho VH, Braga FS, et al. Influence of local anesthetics on the neuromuscular blockade produced by rocuronium: effects of lidocaine and 50% enantiomeric excess bupivacaine on the neuromuscular junction. *Rev Bras Anesthesiol.* 2009;59:725–34.
7. Carvalho VH, Braga AF, Braga FS, et al. The influence of lidocaine and racemic bupivacaine on neuromuscular blockade produced by rocuronium. A study in rat phrenic nerve-diaphragm preparation. *Acta Cir Bras.* 2009;24:211–5.
8. Covino BG. Pharmacology of local anaesthetic agents. *Br J Anaesth.* 1986;58:701–16.
9. McLure HA, Rubin AP. Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol.* 2005;71:59–74.
10. Stoelting RK, Hillier SC. Neuromuscular blocking drugs. In: Stoelting RK, Hillier SC, editors. *Pharmacology & Physiology in Anesthetic Practice.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilk; 2006. p. 208–50.
11. Bulbring E. Observation on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol.* 1946;1:38–61.
12. Cardoso LSM, Martins CR, Tardelli MA. Efeitos da lidocaína por via venosa sobre a farmacodinâmica do rocurônio. *Rev Bras Anesthesiol.* 2005;55:371–80.
13. Matsuo S, Rao DB, Chaudry I, et al. Interaction of muscle relaxants and local anesthetics at the neuromuscular junction. *Anesth Analg.* 1978;57:580–7.
14. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, et al. Anesthetic agents, adjuvants, and drug interaction. In: Barash PG, editor. *Clinical Anesthesia.* 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Kluwer Business; 2009. p. 514–5.
15. Carpenter RL, Mulroy MF. Edrophonium antagonize combined lidocaine-pacuronium and verapamil-pancuronium neuromuscular blockade in cats. *Anesthesiology.* 1986;65:506–10.
16. Neher E, Steinbach JH. Local anesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J Physiol.* 1978;277:153–76.
17. Pederneiras SG. Interação de drogas com relaxantes musculares. *Rev Bras Anesthesiol.* 1988;38:63–73.
18. Suzuki T, Nagai H, Katsumata N, et al. Investigation of fading responses induced by non-depolarising muscle relaxants in the evoked EMG of the gastrocnemius muscle of the cat. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1999;43:658–62.
19. Usubiaga JE, Wikinski JA, Morales RL, et al. Interaction of intravenously administered procaine, lidocaine and succinylcholine in anesthetized subjects. *Anesth Analg.* 1967;46:39–45.
20. Ellis CH, Wnuck AL, De Beer EJ, et al. Modifying actions of procaine on the myoneural blocking actions of succinylcholine, decamethonium and d-tubocurarine in dogs and cats. *Am J Physiol.* 1953;174:277–82.
21. Ulbricht W, Wagner HH. Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. *Pflugers Arch.* 1976;367:77–87.
22. Harvey AL, Marshall IG. The facilitatory actions of aminopyridines and tetraethylammonium on neuromuscular transmission and muscle contractility in avian muscle. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 1977;299:53–60.
23. Harvey AL, Marshall IG. The actions of three diaminopyridines on the chick biventer cervicis muscle. *Eur J Pharmacol.* 1977;44:303–9.