



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Official Publication of the Brazilian Society of Anesthesiology
www.sba.com.br/rba/index.asp



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Efectos Neurotóxicos de Sulfuro de Magnesio Intratecal

Levent Ozdogan ¹, Handan Sastim ¹, Dilsen Ornek* ¹, Aysun Postaci ¹, Taner Ayerden ¹, Bayazit Dikmen ¹

1. Departamento de Anestesiología y Reanimación, Hospital de Entrenamiento e Investigación Ankara Numune, Turquía.
Recibido del Departamento de Anestesiología y Reanimación, Hospital de Entrenamiento e Investigación Ankara Numune, Ankara, Turquía.

Artículo sometido el 3 de enero de 2012. Aprobado para su publicación el 27 de febrero de 2012.

Descritores:

Infusión Espinal;
Microscopía Electrónica;
Sulfuro de Magnesio;
Toxicidad.

Resumen

Justificativa y objetivos: Evaluar los potenciales efectos neurotóxicos en nivel ultraestructural de sulfuro de magnesio administrado por vía intratecal en dosis única o múltiple.

Métodos: Estudio realizado con 24 ratones Sprague-Dawley, con un peso promedio entre los 250 y los 300 g. Después del ayuno de 4 horas, los ratones recibieron 10 mg.kg⁻¹ de cloruro de xilazina por vía intraperitoneal y enseguida fueron divididos aleatoriamente en tres grupos. El grupo I (n = 8) recibió 0,9% de suero fisiológico normal, Grupo II (n = 8) recibió una inyección de 0,02 mL de sulfuro de magnesio al 15% por vía intratecal y Grupo III (n = 8) recibió 0,02 mL de sulfuro de magnesio al 15% una vez por día durante siete días. Las inyecciones fueron aplicadas dentro de 0,40x50 milímetros del área lumbar. Después de siete días, los animales fueron sacrificados con anestesia con una inyección de formaldehído al 10% en la aorta y los tejidos fueron pegados. La médula espinal se examinó y fue histopatológicamente evaluada bajo microscopio electrónico. El test de Kruskal-Wallis fue usado para la evaluación estadística. Un valor de p < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados: La neurodegeneración significativa fue detectada en los ratones que recibieron una sola inyección o inyecciones repetidas de sulfuro de magnesio, en comparación con el grupo control. El puntaje en la evaluación histopatológica de ese grupo también fue alto.

Conclusiones: Basándonos en el examen de microscopía electrónica, descubrimos que la administración intratecal de sulfuro de magnesio indujo a la neurodegeneración.

© 2013 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos los derechos reservados.

Introducción

El hallazgo de los receptores de opioides en el interior de la médula espinal hizo conocidos los métodos de administración de medicamentos por vía intratecal o epidural mundialmente

usados para el tratamiento del dolor agudo o crónico ¹. El sulfuro de magnesio, usado hace muchos años en la pre-eclampsia y eclampsia como anticonvulsivo, también está siendo usado para tratar el infarto del miocardio, algunas arritmias, el asma, feocromocitoma y el tétano. Además, el sulfuro de magnesio, considerado como un bloqueante natural de los canales de calcio, es un antagonista no competitivo de los receptores N-metil-D-aspartato ². Estudios anteriores indicaron que el sulfuro de magnesio tiene un efecto analgésico postoperatorio cuando se administra por

* Correspondencia para: Anaesthesia and Reanimation Department
Ankara Numune Training and Research Hospital Ulku Mahallesi
Talatpasa Bulvarı No: 5, Altindag Ankara 06100, Turkey
E-mail: dilsenpinar@yahoo.com

vía intravenosa³. Además, el sulfuro de magnesio ya ha sido usado anteriormente en seres humanos y animales por vía intratecal por sus efectos analgésicos y neuroprotectores^{4,5}. Sin embargo, se conoce que las secuelas neurológicas permanentes pueden surgir después de la administración espinal o epidural del medicamento⁶.

El objetivo de este estudio fue investigar los potenciales efectos neurotóxicos de la administración intratecal de sulfuro de magnesio a nivel ultraestructural.

Materiales y métodos

Este estudio fue llevado a cabo en el laboratorio de estudios en animales de la Facultad de Medicina Militar Gülhane con el consentimiento del Comité de Ética de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Ankara. Fueron incluidos en el estudio 24 ratones machos de la raza Sprague-Dawley (peso 250-300 g). Los ratones fueron alimentados con 20% de pienso proteico y agua suministrada *ad libitum*, de acuerdo con los criterios de uso y supervisión de animales de laboratorio. Antes del experimento, los animales se mantuvieron en una programación de 12h:12h, noche/día, en condiciones excelentes a 20-22 °C y 55% de humedad. Durante las experiencias, las mismas condiciones fueron mantenidas y los ratones fueron alojados separadamente en jaulas de policarbonato.

Después de un ayuno de 4 horas, los ratones recibieron una inyección intraperitoneal de clorhidrato de cetamina (100 mg.kg⁻¹) y cloruro de xilazina (10 mg.kg⁻¹). Después de anestesiados, los ratones fueron raspados, higienizados y sometidos a la aplicación intratecal (dentro de un área de 0,40x50 milímetros de las vértebras lumbares L5-L6). Después de observar el líquido cefalorraquídeo (LCR), 0,02 mL de la solución en estudio se administró por medio de un inyector Hamilton (calibre 28, puntiagudo, SGE, Australia). Posteriormente a la administración intratecal, los ratones fueron observados para la toxicidad clínica hasta que empezaron a caminar por sí mismos y a alimentarse.

Los ratones fueron aleatoriamente divididos en tres grupos para recibir inyecciones por vía intratecal. El Grupo I (n = 8) recibió 0,02 mL de suero fisiológico normal al 0,9%, el Grupo II (n = 8) 0,02 mL de sulfuro de magnesio al 15% y el Grupo III (n = 8) 0,02 mL de sulfuro de magnesio una vez por día durante siete días. Cada inyección fue administrada dentro de una región de 0,40x50 milímetros del área lumbar. Posteriormente a la observación de movilidad para los signos toxicidad clínica, todos los ratones fueron sacrificados bajo anestesia al octavo día, con una inyección de formaldehído al 10% en la aorta y enseguida se analizaron las médulas espinales.

Las muestras de tejido (1 mm³) de la región lumbar fueron incubadas durante dos horas en glutaraldehído al 2% (pH 7,4) y solución salina con tapón con fosfato (STF). Al final la incubación, los tejidos fueron lavados tres veces con STF y enseguida, pegados al tetróxido de osmio al 1% por una hora. Las muestras de tejidos fueron entonces deshidratadas en serie de alcoholes. Finalmente, los tejidos fueron tratados con óxido de propileno y después montados en bloques de tejidos con el uso del kit de resina epoxi (Araldit CY212 5x100 g). La mitad de las incisiones en el músculo grácil se hizo en los bloques que fueron polimerizados a 56 °C y coloreados con azul de toluidina. El músculo grácil se aisló de las áreas marcadas después de la evaluación en microscopía de luz,

coloreado con acetato de uranilo y citrato de plomo y después evaluado en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss, modelo EM 900.

Alteraciones histopatológicas

Los puntajes de las alteraciones histopatológicas fueron los siguientes: ultra estructura normal (= 0); alteraciones degenerativas en la mitocondria donde el contenido del núcleo y otras organelas estaban normales (= 1) y degeneración mitocondrial con estructuras desordenadas en el retículo endoplasmático granular (REG), defecto en el contenido del núcleo o edema extracelular². Un valor de 0,5 también fue usado entre los hallazgos de 0 y 1, como de 1 y 2.

Evaluación estadística

El test de Kruskal-Wallis fue usado para determinar las diferencias significativas entre los dos grupos. Cuando una diferencia intergrupos fue detectada, el test de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis fue aplicado para determinar el grupo responsable de la diferencia. Todos los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Durante la observación al final del estudio, la movilidad diurna de los ratones de los Grupos I y III y de los ratones en todos los grupos era normal. Ninguno de los animales fue excluido del estudio por ningún motivo. No hubo diferencias estadísticas entre los ratones en los tres grupos con relación al peso antes del estudio (Tabla 1, $p > 0,05$). El valor promedio obtenido a partir de los exámenes histopatológicos fue de 0 (0-0,5) en el grupo control, 1 (1-1) en el Grupo II y 2 (1,5-2) en el Grupo III.

Hubo una diferencia estadísticamente significativa en los índices de toxicidad entre los tres grupos (Figura 1A, $p < 0,001$). La toxicidad fue significativamente mayor en los ratones tratados con una dosis única de sulfuro de magnesio comparados con el grupo control (Figura 1B, $p = 0,002$). Además, los ratones que recibieron dosis repetidas de sulfuro de magnesio tenían una toxicidad más elevada que los controles (Figura 1C, $p = 0,002$). La toxicidad también fue mayor en los ratones que recibieron dosis repetidas de sulfuro de magnesio en comparación con los ratones que recibieron una sola dosis (Grupo II versus III, respectivamente; Figura 1D, $p = 0,008$).

En el examen de microscopía electrónica de la médula espinal, las neuronas multipolares con estructuras normales fueron observados en los ratones control y el núcleo de la célula era cicloide, centralmente localizado y eucromático. Los nucléolos también eran conspicuos y el citoplasma de la célula contenía cisternas del retículo endoplasmático que estaban maduras. La intensidad de los electrones era dependiente de la intensidad del ribosoma. Las mitocondrias tenían estructuras y crista normales (Figura 2).

En el Grupo II, la intensidad de los electrones era dependiente de la intensidad de los ribosomas. El núcleo y el nucléolo de la célula tenían estructuras normales y los gránulos y las cisternas del retículo endoplasmático en el citoplasma estaban maduros. Esos hallazgos fueron similares

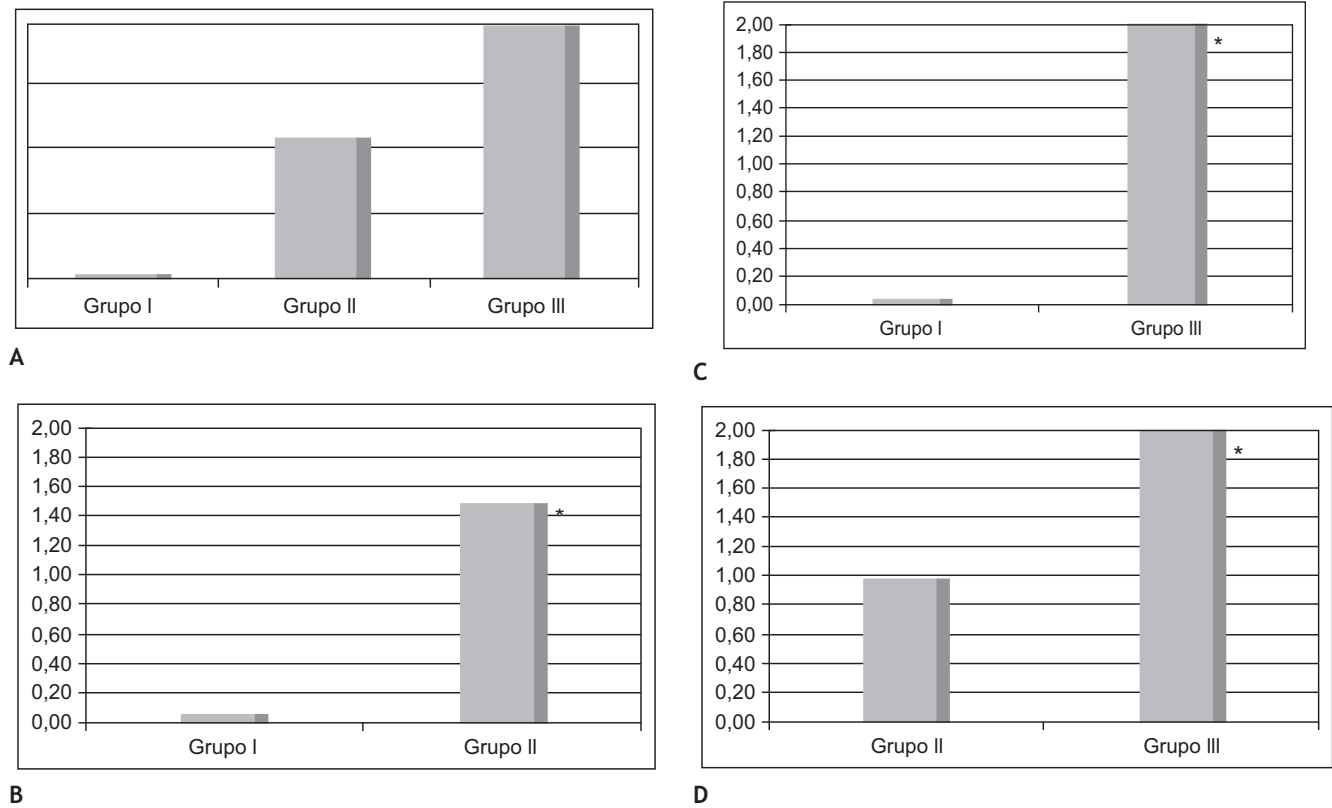


Figura 1 A) Puntaje de Toxicidad de los Grupos I, II y III. B) Comparación de los Puntajes de Toxicidad de los Grupos I y II. C) Comparación de los Puntajes de Toxicidad de los Grupos I y III. D) Puntajes de Toxicidad de los Grupos II y III.

Tabla 1 Peso Corporal de los Ratones Antes y Después del Estudio.

Nº	Grupo	Peso Corporal Primer día (g)	Peso Corporal Último día (g)	P
I	Control	268 ± 17	269 ± 14	> 0,05
II	Dosis única	271 ± 16	273 ± 15	> 0,05
III	Dosis repetida	265 ± 17	266 ± 15	> 0,05

a los del grupo control. Sin embargo, cuando las mitocondrias se analizaron, observamos una degeneración generalizada, y la distensión y la cristalización de las mitocondrias estaban ampliamente diseminadas (Figura 3).

En el Grupo III, alteraciones degenerativas muy distintas se observaron. La pérdida de cromatina era evidente en el núcleo, lo que no fue observado. La disminución de la densidad citoplasmática fue observada y la dilatación conspicua fue detectada en las cisternas del retículo endoplasmático. La cristalización en formas diferentes fue observada en la mitocondria y alteraciones degenerativas muy significativas fueron observadas en las neuronas. Las células examinadas del Grupo III también venían con un aumento poco común en los lisosomas (Figura 4). Basándonos en esas observaciones, la neurodegeneración ultraestructural se concluyó en ese grupo.

Discusión

La ausencia de efectos colaterales graves y el aumento del uso para indicaciones en analgesia han hecho con que el uso del sulfuro de magnesio administrado por vía intravenosa sea

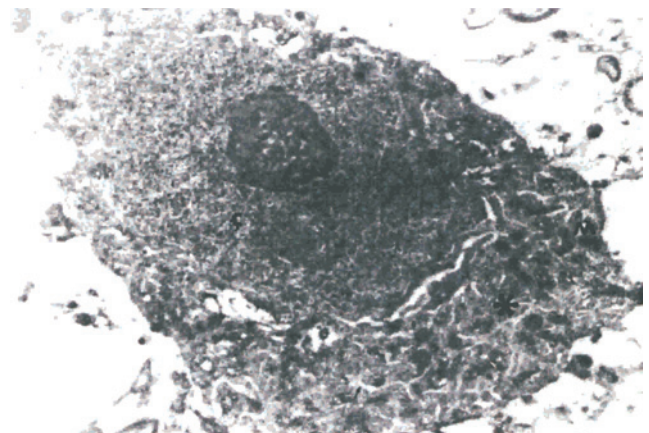


Figura 2 Microscopía Electrónica de Neuronas. N: núcleo; GER: Retículo Endoplasmático Rugoso; M: mitocondrias; (*) intensidad citoplasmática en la microscopía electrónica. Examinado en vista normal (acetato de uranilo-citrato de plomo 440x2,10 µm).

un objeto común en los estudios científicos. Recientemente, el uso del sulfuro de magnesio ha venido siendo explorado también en la anestesia general^{7,8}. El sulfuro de magnesio es reconocido como un antagonista de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) y puede bloquear los canales iónicos asociados a esos receptores. Los receptores antagonistas de NMDA pueden bloquear la sensibilidad central asociada con el estímulo nociceptivo periférico. Estudios demuestran que los receptores antagonistas de NMDA tienen poco efecto directo sobre las fibras C conductoras de dolor, pero su efecto puede aumentar ostensiblemente durante la estimulación repetida⁹. Un estudio realizado por Mitani y col.¹⁰ demostró que alteraciones funcionales en los canales de los receptores

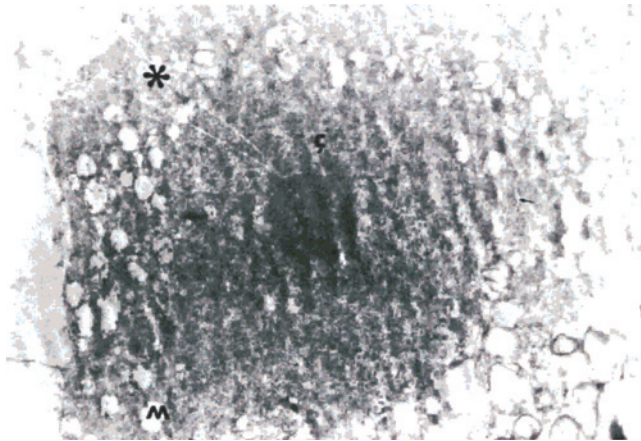


Figura 3 Microscopía Electrónica de Neuronas en el Grupo Sometido a la Dosis Única de Sulfuro de Magnesio.

N: núcleo; GER: Retículo Endoplasmático Rugoso; (*) intensidad citoplasmática en la microscopía electrónica. Todos en estructura normal. Se observan cristales en la mitocondria (acetato de uranilo-citrato de plomo 440x2, 10 µm).

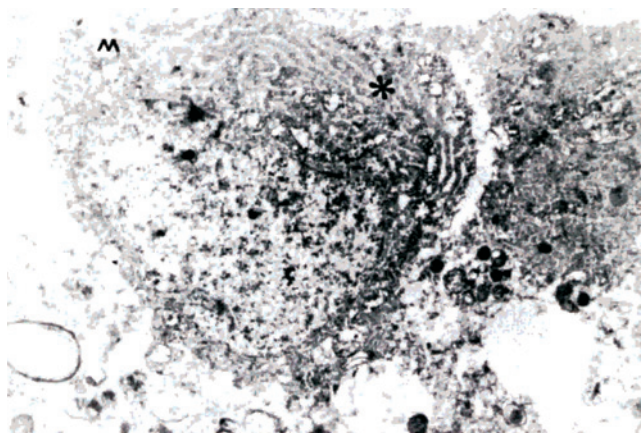


Figura 4 Pérdida de Cromatina, Dilatación GER (Retículo Endoplasmático Rugoso), Reducción de la Intensidad Citoplasmática (*) y Cristales Visibles en el Núcleo de las Neuronas del Grupo Sometido a la Aplicación Repetida de Sulfuro de Magnesio (acetato de uranilo-citrato de plomo 440x2, 10 µm).

de NMDA pueden desempeñar roles específicos en la lesión neuronal. Estudios anteriores demuestran también que el magnesio puede reducir la liberación de acetilcolina¹¹. Y ya que el sulfuro de magnesio deprime el tono colinérgico, ese mecanismo puede desempeñar un papel en la formación del bloqueo motor¹². Por otro lado, Cheng y col.¹¹ sugieren que el glutamato puede aumentar la concentración intracelular de magnesio, lo que puede provocar la neurotoxicidad.

En el estudio de caso conducido por Dror y col.⁴, se verificó que cuando el sulfuro de magnesio al 10% fue administrado vía epidural por equivocación, una irritación similar a la quemadura fue relatada, pero el bloqueo sensorial-motor no se dio. En otro caso, una inyección intratecal de 2 mL de sulfuro de magnesio al 50% administrada por equivocación causó la parálisis motora por 5 horas y un intenso dolor de cabeza, pero sin ninguna pérdida de sensación⁵.

En los ratones Chanimov sometidos a la raquianestesia con inyecciones intratecales en serie de sulfuro de magnesio, observamos más vacuolización en las células ganglionares de la masa gris en el grupo que recibió 0,02 mL de sulfuro de magnesio al 12,6% que en los grupos que recibieron 6,3% de sulfuro, 2% de lidocaína, 0,9% de SF o solamente con un catéter intratecal implantado¹³. En otro estudio, los ratones que recibieron 6,3% de sulfuro de magnesio vía catéter intratecal tenían anestesia espinal y sedación general durante una semana en comparación con los ratones que recibieron lidocaína al 2%¹⁴. Además, los ratones que recibieron sulfuro de magnesio desarrollaron neurotoxicidad clínica y déficit neurológico.

Las lesiones nerviosas pueden ser de origen isquémico, traumático o tóxico. Esas lesiones pueden traer consigo la toxicidad de los axones espinales y muchos componentes del sistema nervioso que pueden afectar directamente las tónicas, como las lesiones vasculares y el tejido cicatricial. Algunos anestésicos locales pueden reducir el flujo sanguíneo y poseen efectos tóxicos^{15,16}. Además, la influencia neurotóxica puede afectar no solamente a la formación citoplasmática, sino también al núcleo directamente¹⁷.

Varios estudios anteriores de neurotoxicidad¹⁸⁻²⁰ evaluaron inyecciones de dosis única y múltiples dosis vía catéter intratecal o epidural. Debido al consenso de que el uso de catéteres intratecales también puede causar cambios histopatológicos, hemos sometido un grupo del estudio a un régimen de dosis repetidas, como también a un régimen de dosis única, porque ambos son usados como rutina en la práctica clínica. En estudios recientes, la formación de granulación epidural, como también en la médula espinal, y fibrinólisis maciza en las raíces espinales, fueron observadas en modelos animales sometidos a la canulación intratecal y a la administración de fármaco en los espacios subaracnoideo y epidural. Infarto del parénquima y absceso apical también fueron observados durante la infusión de un eulpoide sintético. Sin embargo, como algunos de esos cambios también estaban presentes en los animales del grupo control que recibieron solamente suero fisiológico, es bastante difícil distinguir las alteraciones inducidas por el fármaco de otras alteraciones a causa del uso crónico del catéter solo. Además de eso, algunas evidencias indican que el propio catéter puede bloquear el drenaje del LCR y causar alteraciones relacionadas con esa condición²¹.

No queda claro si los estudios morfológicos usados para determinar los efectos neurotóxicos del compuesto por medio de una administración intratecal son suficientes, porque las

toxicidades mediadas por el compuesto pueden tener más de un efecto en la función celular que en la estructura de la célula. La ausencia de las alteraciones morfológicas no es suficiente para determinar si un compuesto tiene un efecto neurotóxico en potencial. Por tanto, los estudios morfológicos y funcionales deben ser realizados concomitantemente durante el análisis toxicológico de un compuesto preparado para el uso humano²².

En este estudio, una neurodegeneración significativa fue observada después de la administración de sulfuro de magnesio, especialmente durante la administración de dosis repetidas. Esa degeneración puede ser el resultado de un aumento extremo en la actividad celular y déficit simultáneo en el metabolismo de energía. Esa degeneración no solamente afecta a la estructura citoplasmática, sino también puede afectar al núcleo. Por tanto, la acumulación intracelular de magnesio también puede ser responsable por la neurodegeneración.

Se cree que los efectos neurotóxicos estén asociados con una concentración de los agentes previamente administrados²³. Sin embargo, en algunos casos, los compuestos que demostraron una potencial neurotoxicidad en los modelos animales terminan siendo clínicamente seguros en humanos en determinadas dosis o concentraciones²⁴. En el presente estudio, sugerimos que la administración intratecal del sulfuro de magnesio en concentraciones de un 15% o más puede causar riesgos imprevistos al paciente.

En este estudio, los ratones no presentaron trastornos de la motilidad después de la administración intratecal de sulfuro de magnesio. Sin embargo, basándonos en el examen microscópico de cada grupo, nuestra hipótesis es la de que la neurodegeneración observada todavía es significativa, especialmente en la administración repetida de sulfuro de magnesio al 15%. Además, el efecto que esa dosificación puede causar en la barrera hematoencefálica, en la corriente sanguínea y en las conducciones nerviosas se desconoce, porque los estudios neurofisiológicos no pudieron ser hechos a causa de dificultades técnicas. En los casos en que la administración de sulfuro de magnesio puede ser clínicamente útil, como en los dolores con aumentos progresivos que no responden a euloides²⁵, el uso a largo plazo puede ser necesario. Hasta ahora no encontramos ningún estudio neurofisiológico relacionado con el uso intratecal de sulfuro de magnesio en animales de experimentación.

Como conclusión, podemos decir que este estudio sugiere que la administración intratecal de sulfuro de magnesio en concentraciones de 15% o más puede causar riesgos imprevistos para el paciente. La neurodegeneración fue observada por microscopía electrónica en animales que recibieron sulfuro de magnesio en esa concentración, especialmente después de la administración repetida, y puede traer como resultado un aumento extremo de la actividad celular y el posterior déficit en el metabolismo de energía. Hasta ahora, los estudios neurofisiológicos relacionados con el uso de sulfuro de magnesio son insuficientes para evaluar la seguridad clínica y por lo tanto, estudios adicionales son necesarios para una caracterización completa.

Referencias

- Barash PG, Cullen BF, Stoelting RF - Handbook of clinical anesthesia, management of acute post-operative pain. 3rd ed. Philadelphia. J.B. Lippincott Company 1997; pp. 1547-1577.
- Asokumar B, McCarthy RJ, Korin JS, Leong W, Perry P, Tuman KJ - Intrathecal magnesium prolongs fentanyl analgesia. *Anesth Analg*, 2002;95:661-666.
- Ko S, Lim H, Kim D, Han Y, Choe H, Song H - Magnesium sulphate does not reduce postoperative analgesic requirements. *Anesthesiology*, 2001;95:640-646.
- Dror A, Henriksen E - Accidental epidural magnesium sulphate injection. *Anesth Analg*, 1987;66:1020-1021.
- Lejstve MJ - Inadvertent intrathecal administration of magnesium of magnesium sulphate. *S Afr Med J*, 1985;68(6):367-368.
- Uğur G, Erhan Y, Yegül I - Effects of two different anesthetic medicine on spinal cord and nerve roots. *Ege University, Medical Faculty Journal*, 1985;24:221-236.
- Meltzer SJ, Auer J - Physiological and pharmacological studies of magnesium salts. 2. The toxicity of intravenous injections, in particular the effects upon the centers of the medulla. *Am J Physiol*, 1996;15:387-405.
- Zalago G, Eisenach JC - Magnesium, anesthesia, and hemodynamic control. *Anesthesiology*, 1991;74:1-10.
- Bahar M, Berman S, Chanimov M, Weissgarten J, Averbukh Z, Cohen ML - Intrathecal anesthesia alters intracellular calcium/magnesium homeostasis in the spinal cord neurons of experimental rats. *European Journal of Anesthesiology*, 2001;18:231-237.
- Mitani A, Watanabe M, Kataoka K - Functional change of NMDA receptors related to enhancement of susceptibility to neurotoxicity in the developing pontine nucleus. *J Neurosci*, 1998;18(19):7941-7952.
- Fawcett WJ, Haxby EJ, Male DA - Magnesium physiology and pharmacology. 1990;83:302-320.
- Martyn JA, Standaert FG, Miller RD - Neuromuscular physiology and pharmacology. In: Miller RD (ed). *Anesthesia*, 5th ed. USA, Churchill Livingstone Inc. 2000; pp. 735-751.
- Chanimov M, Cohen ML, Grinspun Y, Herbert M, Reif R, Kaufman I, Bahar M - Neurotoxicity after spinal anesthesia induced by serial intrathecal injections of magnesium sulphate. *Anaesthesia*, 1997;52:223-228.
- Bahar M, Chanimov M, Grinspun E, Koafman I, Cohen ML - Spinal anaesthesia by intrathecal magnesium sulphate. *Anaesthesia*, 1996;51:627-633.
- Diba A - Magnesium sulphate spinal anesthesia. Correspondence. *Anaesthesia*, 1997;52:187-188.
- Koinig H, Wallner T, Marhofer P, Andel H, Hörauf K, Mayer N - Magnesium sulphate reduces intra and postoperative analgesic requirements. *Anesth Analg*, 1998;87:206-210.
- Cheng C, Reynolds IJ - Subcellular localization of glutamate stimulated intracellular magnesium concentration changes in cultured rat forebrain neurons using confocal microscopy. *Neuroscience*, 2000;95(4):973-979.
- Nuutinen L, Laitinen J - A risk-benefit appraisal of injectable NSAID's in the management of postoperative pain. *Drug Safety*, 1993;9(5):380-393.
- Ready LB, Plummer MH, Haschke RH - Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology*, 1985;63:364-370.
- Malinovsky JM, Lepage JY, Cozian A, Mussini JM, Pinaud M - Is ketamine or its preservative responsible for neurotoxicity in the rabbit? *Anaesthesiology*, 1993;78:109-115.
- Coombs DW, Fratkin JD - Neurotoxicology of spinal agents. *Anesthesiology*, 1987;66:724-726.
- Gordh T Jr, Post C, Olsson Y - Evaluation of the toxicity of subarachnoid clonidine, guanfacine and a substance P antagonist on rat spinal cord and nerve roots. *Anesth Analg*, 1986;65:1303-1311.
- Myers R, Kalichman M, Reisner L, Powell H - Neurotoxicity of local anesthetics. Altered perineural permeability, edema, and nerve fiber injury. *Anesthesiology*, 1986;64:29-35.
- Rodgson PS, Neal JM, Pollock JE, Liu S - The neurotoxicity of drugs given intrathecally. *Anesth Analg*, 1999;88:797-809.
- Pockett S - Spinal cord synaptic plasticity and chronic pain. *Anesth Analg*, 1995;80:173-179.