



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Publicación Oficial de la Sociedade Brasileira de Anestesiologia
www.sba.com.br



ARTÍCULO CIENTÍFICO

Efecto de la asociación ropivacaína-pancuronio en la transmisión neuromuscular. Eficacia de la neostigmina y 4-aminopiridina en la reversión del bloqueo. Estudio experimental[☆]



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

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

^b Farmacología, Facultad de Medicina, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

Recibido el 11 de septiembre de 2013; aceptado el 31 de octubre de 2013

Disponibile en Internet el 5 de enero de 2015

PALABRAS CLAVE

Anestésicos Locales;
Ropivacaína;
Bloqueantes
neuromusculares;
No despolarizantes;
Pancuronio;
Animales, ratones

Resumen

Justificación y objetivos: Los efectos de los anestésicos locales en la unión neuromuscular y su influencia en el bloqueo producido por bloqueantes neuromusculares no-despolarizantes todavía son poco investigados, sin embargo, esta interacción ha sido descrita en trabajos experimentales y en seres humanos. El objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* la interacción de la ropivacaína con el pancuronio, la influencia en la transmisión y bloqueo neuromuscular y la efectividad de la neostigmina y 4-aminopiridina en la reversión del bloqueo.

Método: Unos ratones fueron distribuidos en grupos (n = 5) de acuerdo con el fármaco estudiado: ropivacaína (5 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$); pancuronio (2 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$); ropivacaína + pancuronio. La neostigmina y la 4-aminopiridina fueron usadas en concentraciones de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$, respectivamente. Evaluamos: 1) efectos de la ropivacaína sobre el potencial de membrana y potenciales de placa terminal en miniatura; 2) la amplitud de las respuestas del diafragma antes y 60 min después de la adición de la ropivacaína; el grado de bloqueo neuromuscular con el pancuronio y con la asociación pancuronio-ropivacaína; 3) la efectividad de la neostigmina y 4-aminopiridina en la reversión del bloqueo neuromuscular.

Resultados: La ropivacaína no alteró la amplitud de las respuestas musculares, los potenciales de membrana, pero disminuyó la frecuencia y la amplitud de los potenciales de placa terminal en miniatura. El bloqueo producido por el pancuronio fue potenciado por la ropivacaína, y parcial y totalmente revertido por la neostigmina y 4-aminopiridina, respectivamente.

[☆] Estudio realizado en el Departamento de Anestesiología y Farmacología, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Escuela de Medicina, São Paulo, Brasil.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: franklinbraga@terra.com.br (A.d.F. Braga).

Conclusiones: La ropivacaína potenció el bloqueo neuromuscular producido por el pancuronio. El antagonismo completo con la 4-aminopiridina muestra una acción presináptica de la ropivacaína.

© 2014 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Local anesthetics;
Ropivacaine;
Neuromuscular
blockers;
Nondepolarising;
Pancuronium;
Animals, rats

Effect of ropivacaine combined with pancuronium on neuromuscular transmission and effectiveness of neostigmina 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 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); pancuronium (2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); ropivacaine + pancuronium. Neostigmine and 4-aminopyridine were used at concentrations of 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The effects of ropivacaine on membrane potential) and miniature end-plate potential, the amplitude of diaphragm responses before and 60 min 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.

Introducción

Los anestésicos locales, particularmente las amino-amidas, son un grupo de fármacos ampliamente utilizados por diferentes vías de administración, tales como: tópica, infiltración subcutánea, bloqueo de nervios periféricos, anestesia neuroaxial aislada o asociada con la anestesia general¹⁻⁴.

Existen evidencias de que esos fármacos pueden interferir en la transmisión neuromuscular y potenciar los efectos de los bloqueantes neuromusculares¹⁻⁷.

La ropivacaína es un anestésico local amino-amida con propiedades fisicoquímicas similares a la bupivacaína (S50%-R50%), exceptuando la menor potencia y el menor grado de bloqueo motor, con una mayor selectividad por fibras nerviosas sensitivas, características atribuidas a una menor liposolubilidad y a su estructura de isómero puro S⁻ en oposición a la mezcla racémica de la bupivacaína^{8,9}.

Estas características también son las responsables de la menor toxicidad cardíaca y del sistema nervioso central,

ventajas presentadas por la ropivacaína sobre la bupivacaína (S50%-R50%)^{8,9}. El pancuronio es un bloqueante neuromuscular no despolarizante, aminoesteroideo y de larga duración, lo que justifica su uso en las cirugías prolongadas y en cuidados intensivos¹⁰.

El objetivo de este estudio fue calcular en un modelo experimental, el efecto de la ropivacaína en la transmisión neuromuscular, su influencia en el bloqueo neuromuscular producido por el pancuronio y la eficacia de la neostigmina y de la 4-aminopiridina en la reversión del bloqueo.

Método

Se trata de un estudio experimental *in vitro*, en el que se utilizan los procedimientos de acuerdo con los principios éticos en la experimentación animal adoptados por el Colegio Brasileño de Experimentación Animal (COBEA), que fueron aprobados por la Comisión de Ética en Experimentación Animal del Instituto de Biología de la *Universidade Estadual de Campinas* (protocolo n.º 2346-1).

Fueron utilizados ratones machos de la raza Wistar, con peso entre 180-250g. Los animales fueron anestesiados con uretana ($1,2\text{ mg/kg}^{-1}$, vía intraperitoneal), y enseguida fueron exanguinados mediante sección de los vasos del cuello para facilitar la identificación y la retirada del hemidiafragma izquierdo y la porción del nervio frénico correspondiente. Para la evaluación del efecto de la ropivacaína sobre la transmisión neuromuscular, su influencia en el bloqueo producido por el pancuronio y la efectividad de la neostigmina y de la 4-aminopiridina en la reversión del bloqueo neuromuscular fue utilizada la técnica descrita por Bulbring¹¹. Las preparaciones fueron fijadas en un recipiente con 40 ml de solución nutritiva de Tyrode, oreadas constantemente con carbógeno ($95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$) y mantenidas a 37°C . El nervio fue colocado sobre electrodos de platina conectados a un estimulador Grass S48. El diafragma se mantuvo por su porción tendinosa bajo tensión constante (5 g), a través de un cable conectado al transductor isométrico Load Cell BG50 GMS, y sometido a la estimulación indirecta de 0,1 Hz de frecuencia y duración de 0,2 m/seg; las variaciones de tensión producidas por las contracciones del diafragma fueron registradas en un fisiógrafo Gould RS 3400. Para evaluar el efecto de los fármacos usados aisladamente y asociados con la transmisión neuromuscular, fueron formados 3 grupos ($n=5$): grupo I – ropivacaína ($5\ \mu\text{g/ml}^{-1}$); grupo II – pancuronio ($2\ \mu\text{g/ml}^{-1}$); y grupo III – pancuronio ($2\ \mu\text{g/ml}^{-1}$), en preparación previamente expuesta a la ropivacaína ($5\ \mu\text{g/ml}^{-1}$). En el grupo III (ropivacaína-pancuronio), el pancuronio fue añadido a la preparación 30 min después de la adición de la ropivacaína. Las respuestas musculares a la estimulación indirecta fueron registradas durante 60 min después de la adición de los fármacos.

La misma preparación fue utilizada para estudiar la efectividad de los fármacos (neostigmina [$2\ \mu\text{g/ml}^{-1}$] y 4-aminopiridina [$20\ \mu\text{g.ml}^{-1}$]) en la reversión del bloqueo neuromuscular, que fueron añadidas a la preparación después del bloqueo producido por la asociación ropivacaína-pancuronio. También fueron estudiados, en diafragma de ratones, los efectos de la ropivacaína en los

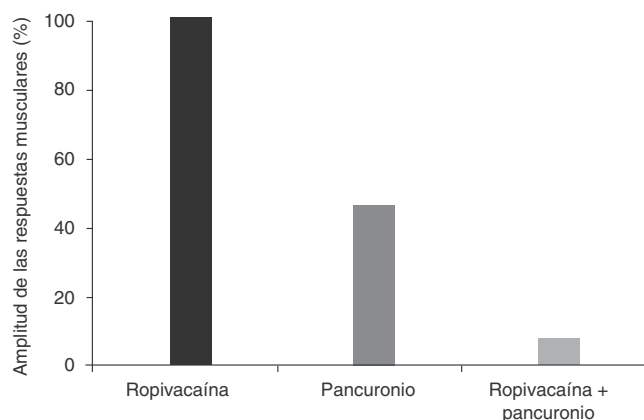


Figura 1 Amplitud de las respuestas musculares a la estimulación indirecta en preparación nervio frénico-diafragma de ratón expuesto a ropivacaína ($5\ \mu\text{g/ml}^{-1}$), pancuronio ($2\ \mu\text{g/ml}^{-1}$) y ropivacaína + pancuronio.

potenciales de placa terminal en miniatura y en los potenciales de membrana. Los parámetros evaluados fueron: 1) la amplitud de las respuestas del diafragma a la estimulación indirecta, antes y 60 min después de la adición de ropivacaína; 2) la amplitud de las respuestas del diafragma a la estimulación indirecta, antes y 60 min después de la adición del pancuronio aisladamente y en preparación previamente expuesta a la ropivacaína; 3) los potenciales de membrana y potenciales de placa terminal en miniatura; y 4) la efectividad de la neostigmina y de la 4-aminopiridina en la reversión del bloqueo neuromuscular.

Los resultados se expresaron en medias y desviaciones estándar. El test de Wilcoxon fue usado para el análisis del potencial de membrana de las fibras musculares y la efectividad de los fármacos que revierten el bloqueo. Para evaluar la reducción de la amplitud de las respuestas musculares fue utilizado el test de la t de Student (distribución normal). Se tomó como un nivel significativo del 5% ($p < 0,05$). El poder del test fue calculado y se obtuvo $\beta > 20\%$ (poder $> 80\%$).

Resultados

La ropivacaína en la concentración estudiada y usada aisladamente no causó ninguna reducción en la amplitud de las respuestas musculares a la estimulación eléctrica indirecta, en preparación nervio frénico-diafragma de ratón. Con el pancuronio aisladamente y en las preparaciones previamente expuestas a la ropivacaína, los promedios de amplitud de las respuestas musculares fueron del 45,1% y del 6,2% respectivamente, y el bloqueo correspondiente fue del $54,9 \pm 14,1\%$ y del $93,8 \pm 9,2\%$ respectivamente, con una diferencia significativa ($p=0,015$) (figs. 1 y 2).

El bloqueo neuromuscular causado por el pancuronio en las preparaciones expuestas a la ropivacaína fue revertido parcial y totalmente por la neostigmina y por la 4-aminopiridina, respectivamente.

No fue observado efecto significativo de la ropivacaína sobre los potenciales de membrana (fig. 3). Los efectos sobre los potenciales de placa terminal en miniatura se caracterizan por una disminución en la frecuencia y amplitud hasta el bloqueo total.

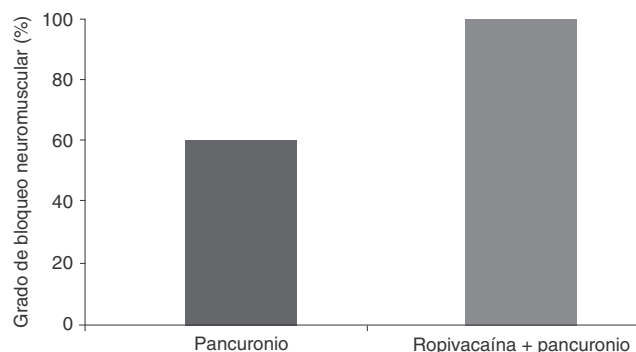


Figura 2 Grado de bloqueo con pancuronio aisladamente y en preparación previamente expuesta a ropivacaína.

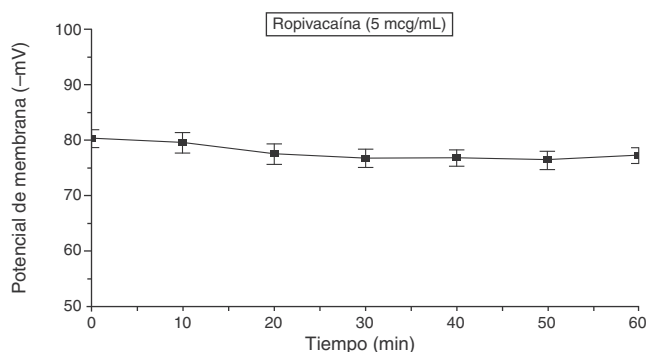


Figura 3 Efecto de la ropivacaína ($5 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) en el potencial de membrana en preparación diafragma de ratón.

Discusión

Los efectos de los anestésicos locales en la unión neuromuscular y su influencia en el bloqueo producido por bloqueantes neuromusculares no despolarizantes todavía necesita investigación; sin embargo, esta interacción ha sido descrita en trabajos experimentales y en seres humanos^{1-7,12}. Estudios experimentales^{5-7,13} han ofrecido una base para los resultados observados en la clínica, con la ventaja de la posibilidad de eliminar un sesgo, que es la gran variabilidad individual de la respuesta a los bloqueantes neuromusculares^{10,14}.

Aunque solo en altas dosis los anestésicos locales puedan producir bloqueo neuromuscular, la interacción con los bloqueantes neuromusculares, particularmente los no despolarizantes, es clínicamente relevante, siendo necesaria una observación cuidadosa cuando se usen simultáneamente esos agentes, o en situaciones en las que el margen de seguridad de la transmisión neuromuscular esté reducida^{1-4,12,14,15}.

Son admitidos varios mecanismos para explicar la interacción entre los anestésicos locales y los bloqueantes neuromusculares. En la región presináptica, deprimen selectivamente la conducción en las fibras motoras e inhiben la liberación de la acetilcolina durante la estimulación nerviosa. Al nivel post-sináptico, los anestésicos locales pueden conectarse con diferentes sitios específicos de acetilcolina, trayendo como resultado la desensibilización de los receptores, además de poder ocasionar la oclusión temporal de los canales de los receptores nicotínicos. Por añadidura, son descritas una acción estabilizadora de la membrana postunión y la interferencia con el mecanismo de excitación-contracción de la fibra muscular^{5-7,11,13,16-19}.

La concentración de ropivacaína usada se estableció en un proyecto piloto y fue determinada a partir de datos presentados en estudios realizados en nuestro medio, donde fueron utilizados otros anestésicos locales amino-amidas con características similares a la ropivacaína^{6,7}. Matsuo et al.¹³, en una preparación similar a la utilizada en este estudio, calcularon la asociación de d-tubocurarina con diferentes anestésicos locales, y observaron que incluso en concentraciones ineficaces los anestésicos locales potenciaron el bloqueante neuromuscular, evidenciado por la disminución significativa de la ED50. Con relación a la influencia de los bloqueantes neuromusculares en los efectos de los anestésicos locales, esos autores

también describieron que concentraciones ineficaces de d-tubocurarina causaron una disminución similar de la ED50 y el aumento en la potencia de los anestésicos locales.

En un ensayo clínico, Sahin et al.⁴ evaluaron las características del bloqueo neuromuscular producido por el vecuronio en pacientes sometidos a anestesia general asociada con bloqueo epidural con levobupivacaína al 0,5% (15 ml), y observaron un aumento significativo en el índice de recuperación y en la duración total del efecto del vecuronio, sin influir en su duración clínica (DC25%). Esos hallazgos pueden ser justificados por el hecho de que el metabolismo de la levobupivacaína, cuando se usa en el espacio epidural, solo ocurre en aproximadamente 30 min, cuando el fármaco llega a la circulación¹.

El presente estudio mostró que, en la concentración estudiada, la ropivacaína usada aisladamente no ejerció efectos en la unión neuromuscular; sin embargo, potenció el bloqueo producido por el pancuronio. Esos resultados son similares a los de otros autores, que no observaron en trabajos experimentales y clínicos ningún daño en la transmisión neuromuscular, cuando se usaron aisladamente diferentes anestésicos locales. Sin embargo, fue descrita una evidente potencialización en el efecto de varios bloqueantes neuromusculares como resultado de la asociación de esos fármacos, interacción que puede ser consecuente con la potencialización verdadera en diferentes lugares de la unión neuromuscular^{1,2,4-7,12,13,20}, causada por la acción de los 2 tipos de fármacos.

Se cree que el mayor bloqueo neuromuscular ocasionado por el pancuronio en las preparaciones de diafragma de ratones previamente expuestas a la ropivacaína, y evidenciado por una mayor reducción en la amplitud de las respuestas musculares a la estimulación del nervio frénico, sea debido a una acción presináptica de la ropivacaína, y no a la acción despolarizante en la fibra muscular, puesto que en los estudios electrofisiológicos se vio que la ropivacaína en la concentración usada no alteró el potencial de membrana de las fibras musculares. La acción presináptica quedó demostrada por la disminución en la frecuencia y amplitud de los potenciales de placa terminal en miniatura ocasionada por la ropivacaína, como resultado de la alteración en la liberación cuántica de la acetilcolina.

El bloqueo neuromuscular ocasionado por la asociación ropivacaína-pancuronio fue totalmente revertido con la 4-aminopiridina, y en menor proporción con la neostigmina. Esos resultados también fueron descritos por Sahin et al.⁴, que observaron en seres humanos una mayor eficacia de la 4-aminopiridina con relación a la neostigmina en la reversión de bloqueo ocasionado por el vecuronio en pacientes que recibieron levobupivacaína en el espacio epidural. En trabajos experimentales, resultados similares fueron encontrados en la reversión del bloqueo resultante de la asociación lidocaína-rocuronio⁵.

La neostigmina, al inhibir la acetilcolinesterasa, aumenta la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica, siendo capaz de desplazar competitivamente los agentes causantes del bloqueo. El antagonismo parcial por la neostigmina refuerza ese hallazgo, una vez que los anticolinesterásicos son eficaces solamente en la reversión del bloqueo post-sináptico. La 4-aminopiridina, además del efecto inhibitor de desensibilización de receptores nicotínicos de la placa terminal, provoca un aumento cuántico

de acetilcolina. Ese aumento es resultante de acciones en la membrana de las terminaciones nerviosas, como la inhibición de los canales de potasio, que produce un aumento en la duración del potencial de acción, y el mayor influjo de iones calcio hacia las terminaciones nerviosas motoras durante la despolarización de la membrana²¹⁻²³. El antagonismo completo obtenido con la 4-aminopiridina mostró que la interacción de la ropivacaína con el pancuronio posee un componente presináptico relacionado con la disminución de la liberación de acetilcolina.

La ropivacaína aisladamente no comprometió la transmisión neuromuscular, pero sí potenció el bloqueo producido por el pancuronio, que fue revertido por la neostigmina y la 4-aminopiridina. Esos resultados son importantes para la práctica clínica, en el sentido de ofrecer orientación sobre la necesidad del uso de monitorización de los efectos de los bloqueantes neuromusculares, particularmente cuando se usan asociados con otros fármacos.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Loyola YC, Braga A de 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.
- 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.
- 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.
- Covino BG. Pharmacology of local anaesthetic agents. *Br J Anaesth*. 1986;58:701-16.
- McLure HA, Rubin AP. Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol*. 2005;71:59-74.
- Stoelting RK, Hillier SC. Neuromuscular blocking drugs. En: Stoelting RK, Hillier SC, editores. *Pharmacology and physiology in anesthetic practice*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 208-50.
- Bulbring E. Observation on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol*. 1946;1:38-61.
- Cardoso LSM, Martins CR, Tardelli MA. Efeitos da lidocaína por via venosa sobre a farmacodinâmica do rocurônio. *Rev Bras Anesthesiol*. 2005;55:371-80.
- 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.
- Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, et al. Anesthetic agents, adjuvants, and drug interaction. En: Barash PG, editor. *Clinical anesthesia*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Kluwer Business; 2009. p. 514-5.
- Carpenter RL, Mulroy MF. Edrophonium antagonize combined lidocaine-pacuronium and verapamil-pacuronium neuromuscular blockade in cats. *Anesthesiology*. 1986;65:506-10.
- Neher E, Steinbach JH. Local anesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J Physiol*. 1978;277:153-76.
- Pedreiras SG. Interação de drogas com relaxantes musculares. *Rev Bras Anesthesiol*. 1988;38:63-73.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Harvey AL, Marshall IG. The actions of three diaminopyridines on the chick biventer cervicis muscle. *Eur J Pharmacol*. 1977;44:303-9.