YOLANDA CHRISTINA DE SOUSA LOYOLA

Influência dos Anestésicos Locais no Bloqueio Neuromuscular Produzido por Diferentes Bloqueadores Neuromusculares. Estudo Experimental

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia da Bióloga – Yolanda Christina de Sousa Loyola.

Campinas, 09 de fevereiro de 2006.

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga
- Orientadora -

CAMPINAS

2006

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

YOLANDA CHRISTINA DE SOUSA LOYOLA

Influência dos Anestésicos Locais no Bloqueio Neuromuscular Produzido por Diferentes Bloqueadores Neuromusculares. Estudo Experimental

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Farmacologia.

ORIENTADORA: *Profa. Associada Angélica de F. de Assunção Braga*

CAMPINAS

2006

UNIDADE BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP
/ EX
TOMBO BC/ 70163
PROC 16.123-06
C D X
PREÇO 11,00
DATA 25/09/06
Nº CPD
BIB ID 388137

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Loyola, Yolanda Christina de Sousa
L958i Influência dos anstésicos locais no bloqueio neuromuscular produzido por diferentes bloqueadores neuromusculares. Estudo Experimental / Angélica de Fátima de Assunção Braga. Campinas, SP : [s.n.], 2006.

Orientador : Angélica de Fátima de Assunção Braga
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anestésicos locais. 2. Procaína. 3. Lidocaína. 4. Rocurônio. 5. Bloqueadores neuromusculares. 6. Tubocurarina. 7 Transmissão Sináptica. 8. Interação de Medicamentos. I. Braga, Angélica de Fátima de Assunção. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

(Slp/fcm)

Título em ingles:The influence of local anesthetics on neuromuscular blockade produced by differents neuromusculars blockades.Experimental study

Keywords: • Local Anestetics
• Procaine
• Lidocaine
• Neuromusculars Bolckades
• Tubocurarine
• Rocuronium
• Drug interations
•Synaptic transmission

Titulação: Doutorado

Banca Examinadora: Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga
Profa. Dra. Norma Sueli Pinheiro Módulo
Prof. Dr. Chariston André Dal Belo
Prof. Dr. Edson Antunes
Profa. Dra. Rosa Inês Costa Pereira

Data da Defesa: 09/02/2006

UNICAMP

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador:
Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Membros:
Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Profa. Dra. Norma Sueli Pinheiro Módulo

Prof. Dr. Chariston André Dal Belo

Prof. Dr. Edson Antunes

Prof. Dra. Rosa Inês Costa Pereira

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 09/02/2006

A Deus

Que esteve ao

meu lado durante

todo o tempo segurando

as minhas mãos.

Ao mestre e amigo professor Dr. Marcos Dias Fontana

pelo incentivo, confiança e

principalmente pela sincera amizade dedicada

por um tempo tão curto porém precioso.

A minha eterna gratidão.

"Aceita as surpresas que transformam teus planos
alteram teus sonhos,
dão rumo totalmente diferente ao teu dia e,
quem sabe, a tua vida.

As coisas não acontecem por acaso...

Dê liberdade a Deus Pai, para que ele mesmo
conduza o desenrolar de nossos dias."

(Dom Helder Câmara)

A Dra Angélica de Fátima de Assunção Braga, minha orientadora e amiga, pelo apoio, competência e carinho.

Aos meus pais: Carlos e Heloísa e ao meu irmão Sérgio por acreditarem nesse sonho.

A minha querida tia Regina e a vovó Dália pelas bênçãos que vieram do céu.

As minhas afilhadas Bebella e Bellinha por fazerem tudo valer a pena.

Aos professores: Dr. Edson Antunes, Dra. Albetiza Lobo e a Dra Eneida de Paula pelas sugestões importantes no exame de qualificação.

A Sirley Siane Morais pela orientação na análise estatística do trabalho e a Dra Arneth Rodrigues Ribeiro pela colaboração com o inglês.

A Professora Dra. Lea Rodrigues Simioni pela importante ajuda no inicio do trabalho.

Ao técnico e amigo Toninho pela valiosa colaboração na parte experimental desse estudo e ao Sr. Miguel pela ajuda com os animais de laboratório.

Ao Gildo, Wanderley, Fran, Elaine e ao pessoal da limpeza pela colaboração e amizade.

Aos amigos Arthur e Babi pela atenção e colaboração durante toda a realização desse trabalho.

As amigas Lia, Thalita, Samantha, Silmara e Caroline pela colaboração, incentivo e carinho.

PÁG.

RESUMO ..... *xlv*

ABSTRACT ..... *xlix*

1- INTRODUÇÃO 53

1.1- Farmacologia dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína 55

1.2- Efeitos dos anestésicos locais sobre a placa mioneural 58

1.3-Farmacologia dos bloqueadores neuromusculares: d-Tubocurarina e Rocurônio 64

1.4- Interação anestésicos locais– bloqueadores neuromusculares 66

2- OBJETIVOS 69

2.1- Geral 71

2.2- Específicos 71

3- MATERIAIS E MÉTODOS 73

3.1- Animais utilizados 75

3.2- Fármacos e concentrações utilizadas 75

3.3- Estudos miográficos 76

3.3.1- Preparação nervo-frênico-hemidiafragma de rato 76

3.3.2- Influência dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína na transmissão neuromuscular e no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina e rocurônio. 77

3.3.3- Influência dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína sobre a ação contraturante da acetilcolina - Preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado 78

3.3.4- Influência dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína sobre a ação contraturante da acetilcolina - Preparação músculo *biventer cervis* de pintainho..... 79

3.4- Estudos eletrofisiológicos..... 80

3.4.1-Montagem da Preparação e Confecção dos microeletrodos (Me)..... 80

3.4.2- Descrição do circuito..... 81

3.4.3- Medida da resistência do microeletrodo..... 82

3.4.4- Influência dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína nos Potenciais de Membrana (PM)..... 83

3.4.5- Influência dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína nos Potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM).... 83

3.5- Análise estatística..... 84

4- RESULTADOS..... 85

4.1- Estudos Biológicos..... 87

4.1.1- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) e dos Bloqueadores Neuromusculares (d-tubocurarina e rocurônio) nas respostas musculares em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato..... 87

4.1.2- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) no bloqueio neuromuscular produzido pelos Bloqueadores Neuromusculares (d-tubocurarina e rocurônio) em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato..... 89

4.1.3- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) na ação contraturante da acetilcolina. Preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado..... 95

4.1.4- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) na ação contraturante da acetilcolina. Preparação *biventer cervicis* de pintainho..... 98

4.2- Estudos eletrofisiológicos..... 101

4.2.1- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) nos Potenciais de Membrana (PM)..... 101

4.2.2- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) nos Potenciais de Placa Terminal em Miniatura (PPTM)..... 104

5- DISCUSSÃO..... 107

6- CONCLUSÕES..... 119

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 123

8- ANEXOS..... 133

Anexo 1- COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – IB – UNICAMP – PROTOCOLO N^{O} 885-2..... 135

Anexo 2- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.... 137

Anexo 3- PROCESSO EDITORIAL RBA- 353/05..... 139

Anexo 4- ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO – RBA..... 131

Anexo 5- PROCESSO EDITORIAL MEDVEP – 00229..... 153

Anexo 6- ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO – MEDVEP..... 155

Anexo 7- TABELAS..... 175

Ach	Acetilcolina
4AP:	4-aminopiridina
°C:	Graus Celsius
d-Tc:	d-tubocurarina
DP:	desvio padrão
g:	grama
Hz:	hertz
Kg:	kilograma
M:	molar
Me:	microeletrodo
mg:	miligrama
mL:	mililitro
mM:	milimolar
min:	minutos
ms:	milisegundos
MΩ:	miliohms
mV:	milivolts
µg:	micrograma
n:	número de experimentos
pptm:	potencial de placa terminal em miniatura
v:	volts
$\bar{X}$:	médias

PÁG.

Tabela 1- Valores médios e desvios padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de hemidiafragma de rato expostas a procaína (40μg/mL..... 102

Tabela 2- Valores médios e desvios padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de hemidiafragma de rato expostas a lidocaína (20μg/mL)..... 103

Tabela 3- Valores individuais, média e desvio padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato, causada pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) isoladamente e pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) em preparação previamente exposta a procaína (40μg/mL)..... 175

Tabela 4- Valores individuais, média e desvio padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato, causada pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) isoladamente e pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) em preparação previamente exposta a lidocaína (20μg/mL)..... 176

Tabela 5- Valores individuais, média e desvio-padrão da amplitude das respostas musculares (%) a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato, após a adição da neostigmina (2μg/mL) para reversão do bloqueio causado pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) em preparação previamente exposta a procaína (40μg/mL)..... 177

Tabela 6- Valores individuais, média e desvio padrão da amplitude das respostas musculares (%) a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato, após a adição da neostigmina (2μg/mL) para reversão do bloqueio causado pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) em preparação previamente exposta a lidocaína (20μg/mL)..... 178

Tabela 7- Valores individuais, média e desvio padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato, causada pelo rocurônio (4μg/mL) isoladamente e pelo rocurônio (4μg/mL) em preparação previamente exposta a procaína (40μg/mL)... 179

Tabela 8- Valores individuais, média e desvio padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato, causada pelo rocurônio (4μg/mL) isoladamente e pelo rocurônio (4μg/mL) em preparação previamente exposta a lidocaína (20μg/mL).. 180

Tabela 9- Valores individuais, média e desvio padrão da amplitude das respostas musculares (%) a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato, após a adição da neostigmina (2μg/mL) para reversão do bloqueio causado pelo rocurônio (4μg/mL) em preparação previamente exposta a procaína (40μg/mL)..... 181

Tabela 10- Valores individuais, média e desvio padrão da amplitude das respostas musculares (%) a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato, após a adição da neostigmina (2μg/mL) para reversão do bloqueio causado pelo rocurônio (4μg/mL) em preparação previamente exposta a lidocaína (20μg/mL)..... 182

Tabela 11- Valores individuais, média, desvio padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta muscular a acetilcolina (5μg/mL), em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado, antes e após a adição de procaína (40μg/mL)..... 183

Tabela 12- Valores individuais, média, desvio padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta muscular a acetilcolina (5μg/mL), em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado, antes e após a adição de lidocaína (20μg/mL)..... 184

Tabela 13- Valores individuais, média, desvio padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta muscular a acetilcolina (5μg/mL), em preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e após a adição de procaína (40μg/mL)... 185

Tabela 14- Valores individuais, média, desvio padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta muscular a acetilcolina (5μg/mL), em preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e após a adição de lidocaína (20μg/mL).. 186

		PÁG.
Figura 1-	Estrutura molecular dos anestésicos locais.....	56
Figura 2-	Estrutura molecular da procaína.....	57
Figura 3-	Estrutura molecular da lidocaína.....	57
Figura 4-	Fórmula estrutural da d-tubocurarina.....	65
Figura 5-	Fórmula estrutural do rocurônio.....	65
Figura 6-	Esquema da preparação nervo frênico – hemidiafragma de rato.....	77
Figura 7-	Microeletrodo e montagem de aparelhagem para os experimentos eletrofisiológicos.....	82
Figura 8-	Efeito da procaína (40μg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). **A**: adição de procaína; **B**: 60 minutos após a adição da procaína.....	87
Figura 9-	Efeito da lidocaína (20μg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). **A**: adição de lidocaína; **B**: 60 minutos após a adição de lidocaína.....	88

Figura 10- Efeito da d-tubocurarina (0,3μg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). **A**: adição de d-tubocurarina; **B**: 60 minutos após a adição de d-tubocurarina..... 88

Figura 11- Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). A: adição de rocurônio; B: 60 minutos após a adição de rocurônio..... 89

Figura 12- Efeito da d-tubocurarina (0,3μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas à procaína (40μg/mL). Efeito da neostigmina. **A**: adição de procaína; **B**: adição de d-tubocurarina, 30 minutos após exposição à procaína; **C**: 60 minutos após adição de d-tubocurarina; **D**: adição da neostigmina (2,0 μg/mL)..... 90

Figura 13- Efeito da d-tubocurarina (0,3μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas a lidocaína (20μg/mL). Efeito da neostigmina. **A**: adição de lidocaína; **B**: adição da d-tubocurarina, 30 minutos após exposição à lidocaína; **C**: 60 minutos após adição de d-tubocurarina; **D**: adição da neostigmina (2,0 μg/mL)..... 90

Figura 14- Efeito da d-tubocurarina (0,3μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas à procaína (40μg/mL). Efeito da 4 aminopiridina. **A**: adição de procaína; **B**: adição de d-tubocurarina, 30 minutos após exposição à procaína; **C**: 60 minutos após adição de d-tubocurarina; **D**: adição de 4-aminopiridina (20 μg/mL).... 91

Figura 15- Efeito da d-tubocurarina (0,3μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas a lidocaína (20μg/mL). Efeito da 4 - aminopiridina. **A**: adição de lidocaína; **B**: adição de d-tubocurarina, 30 minutos após a lidocaína; **C**: 60 minutos após adição da d-tubocurarina; **D**: adição de 4-aminopiridina (20 μg/mL)..... 92

Figura 16- Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), nas preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas à procaína (40μg/mL). Efeito da 4 - aminopiridina. **A**: adição de procaína; **B**: adição de rocurônio, 30 minutos após a procaína; **C**: 60 minutos após adição de rocurônio; **D**: adição de 4-aminopiridina (20 μg/mL)..... 92

Figura 17- **Figura 17.** Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas a lidocaína (20μg/mL). Efeito da 4 - aminopiridina. **A**: adição de lidocaína; **B**: adição de rocurônio, 30 minutos após a lidocaína; **C**: 60 minutos após adição de rocurônio; **D**: adição de 4-aminopiridina (20 μg/mL)..... 93

Figura 18- **Figura 18.** Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas à procaína (40μg/mL). Efeito da neostigmina. **A**: adição de procaína; **B**: adição de rocurônio, 30 minutos após a procaína; **C**: 60 minutos após adição de rocurônio; **D**: adição de neostigmina (2 μg/mL)..... 94

Figura 19- Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico - hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas a lidocaína (20μg/mL). Efeito da neostigmina. **A**: adição de lidocaína; **B**: adição de rocurônio, 30 minutos após a lidocaína; **C**: 60 minutos após adição de rocurônio; **D**: adição de neostigmina (2 μg/mL)..... 94

Figura 20- **Figura 20.** Registro miográfico do efeito da procaína (40 μg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5μg/mL) em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado (n=5), sob estimulação elétrica direta (freqüência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A**: controle; **B**: adição de acetilcolina; **C**: 30 minutos após a adição de procaína, **D**: adição de acetilcolina..... 95

Figura 21- Registro miográfico do efeito da lidocaína (20 μg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5μg/mL) em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado (n=5), sob estimulação elétrica direta (freqüência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A**: controle; **B**: adição de acetilcolina; **C**: 30 minutos após a adição de lidocaína, **D**: adição de acetilcolina..... 97

Figura 22- Registro miográfico do efeito da procaína (40 μg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5μg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho (n=5), sob estimulação elétrica indireta (freqüência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A**: controle; **B**: adição de acetilcolina; **C**: 30 minutos após a adição de procaína, **D**: adição de acetilcolina..... 99

Figura 23- Registro miográfico do efeito da lidocaína (20 μg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5μg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho (n=5), sob estimulação elétrica indireta (freqüência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A**: controle; **B**: adição de acetilcolina; **C**: 30 minutos após a adição de lidocaína; **D**: adição de acetilcolina..... 100

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

Figura 24- Efeito da procaína (40μg/mL) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação hemidiafragma de rato. **A**: antes da adição de procaína (controle); **B**: 30 minutos após a adição de procaína; **C**: 60 minutos após a adição da procaína..... 104

Figura 25- Efeito da lidocaína (20μg/mL) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação hemidiafragma de rato. **A**: antes da adição de lidocaína (controle); **B**: 30 minutos após a adição de lidocaína; **C**: 60 minutos após a adição da lidocaína..... 105

PÁG.

Gráfico 1- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5μg/mL) em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado, antes e 30 minutos após a procaína (40μg/mL)..... 96

Gráfico 2- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5μg/mL) em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado, antes e 30 minutos após a lidocaína (20μg/mL)..... 98

Gráfico 3- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5μg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a procaína (40μg/mL)..... 99

Gráfico 4- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5μg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a lidocaína (20μg/mL)..... 101

Gráfico 5- Efeito da procaína (40 μg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa à média ± desvio padrão de cinco experimentos..... 102

Gráfico 6- Efeito da lidocaína (20 μg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa à média ± desvio padrão de cinco experimentos..... 103

RESUMO

Os anestésicos locais comumente empregados na prática clínica podem interagir com os bloqueadores neuromusculares e potencializar seus efeitos. Muitos autores estudaram esta interação mas o mecanismo envolvido na potencialização do bloqueio neuromuscular e a ação dos anestésicos locais nos sítios pré e pós juncionais não foram completamente elucidados. Neste trabalho através de experimentos específicos na junção neuromuscular foram estudados os seguintes parâmetros: o efeito dos anestésicos locais procaína e lidocaína na transmissão neuromuscular; a sua influência no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina e pelo rocurônio; a eficácia da neostigmina e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio produzido pela associação anestésicos locais - bloqueadores neuromusculares; os efeitos dos anestésicos locais nos potenciais de membrana e potenciais de placa terminal em miniatura. Avaliou-se também em preparações diafragma de rato cronicamente desnervado e biventer cervicis de pintainho os efeitos dos anestésicos locais na ação contraturante da acetilcolina. Os resultados foram expressos em médias e desvios padrão e analisados através dos testes de Wilcoxon e Mann-Witney, adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Nas preparações nervo frênico - diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta, os anestésicos locais nas concentrações empregadas, não alteraram a amplitude das respostas musculares mas potencializaram os efeitos da d-tubocurarina e do rocurônio.. Este bloqueio foi parcialmente e totalmente revertido pela neostigmina e pela 4-aminopiridina, respectivamente. A procaína e a lidocaína não causaram alteração significativa nos potenciais de membrana, não demonstrando ação despolarizante na fibra muscular. A procaína causou diminuição na amplitude e na freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptms) e a lidocaína, ao contrário, promoveu um aumento inicial na freqüência dos pptms seguida de bloqueio. Nas preparações biventer cervicis de pintainho e diafragma de rato cronicamente desnervado, a procaína e a lidocaína promoveram diminuição significativa na resposta contraturante da acetilcolina evidenciando um efeito pós-juncional. Os resultados obtidos demonstram um sinergismo entre as drogas devido principalmente a um efeito pós-juncional.

ABSTRACT

Local anesthetics commonly used in clinical practice can interact with neuromuscular blockers and potentiate their effects. Many authors studied this interaction, but the mechanism involved in the potentiation of neuromuscular blockers and the action of local anesthetics in the pre and postjunctional sites were not completely elucidated. In this study, in specific experiments in the neuromuscular junction the following parameters were studied: the effects of the local anesthetics procaine and lidocaine in the neuromuscular transmission; its influence on the neuromuscular blockade produced by d-tubocurarine and by rocuronium; the efficacy of neostigmine and of 4-aminopyridine in the reversion of the blockade produced by the association of local anesthetics - neuromuscular blockers; the effects of local anesthetics on the membrane potentials and miniature end - plate potentials.

It was also evaluated in chronically denervated rat diaphragm preparation and chick biventer cervicis preparation the effects of local anesthetics on acetylcholine contracture. The results were expressed in average and standard deviation and analyzed through the Wilcoxon and Mann-Witney tests, adopting a level of significance of 5% ($p < 0.05$). In rat phrenic nerve diaphragm preparations under indirect electric stimulation, local anesthetics in the concentrations used did not change the amplitude of the muscle response but potentiated the effects of d-tubocurarine and of rocuronium. This blockade was partially and totally reverted by neostigmine and by 4-aminopyridine, respectively.

Procaine and lidocaine caused no significant alteration in the membrane potentials, not demonstrating depolarizing action in the muscle fiber. Procaine caused a decrease in the amplitude and frequency of the miniature end – plate potentials (meps) and lidocaíne, in contrast, promoted an initial increase in the frequency of meps followed by blockade. In chick biventer cervicis preparations and chronically denervated rat diaphragm, procaine and lidocaine promoted a significant decrease in the response to acetylcholine contracture evidencing a post-junctional effect. The results obtained demonstrate a synergism among the drugs mainly due to a postjunctional effect.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Farmacologia dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína

Os anestésicos locais são substâncias capazes de bloquear, de forma reversível, os potenciais de ação responsáveis pela condução nervosa. Bloqueiam a condução do impulso nervoso reduzindo ou impedindo o grande e transitório aumento na permeabilidade das membranas excitáveis ao Na^+, produzido por uma discreta despolarização da membrana. Esta ação é decorrente de sua interação direta com os canais de Na^+ voltagem dependentes (CATTERALL e MACKIE, 1996).

Para RUBIN (1994), o anestésico local precisa penetrar na fibra nervosa e em seguida, a forma catiônica bloqueia os canais de sódio, evitando o influxo deste íon, resultando em bloqueio da despolarização da membrana. O bloqueio é dependente da concentração e termina quando esta atinge um nível abaixo do mínimo crítico.

Os anestésicos locais por serem pouco solúveis em água são disponíveis para uso sob forma de sal (cloridrato) solúvel, resultante da reação entre uma amina (base fraca) e um ácido forte (geralmente ácido clorídrico). O sal resultante se dissociará em cátion e base, em proporções que dependerão do pH do meio e da constante de dissociação da droga (pKa) (DUVAL NETO, 1984; BIANCONI, 1998). Ambas as formas do anestésico local estão envolvidas no processo total de penetração e bloqueio da condução nervosa, sendo a forma básica responsável pela difusão da droga através da membrana nervosa. Após a penetração, ocorre re-equilíbrio entre as formas básicas e catiônicas, quando, então, estas últimas deslocam os íons Ca^{++} dos sítios receptores lipoprotéicos, localizados na superfície interna da membrana celular, bloqueando os canais de sódio, decrescendo a permeabilidade a estes íons e inibindo a despolarização da membrana (BRAZ et al, 1983).

A maioria dos anestésicos locais se apresentam na forma de aminas terciárias (raramente secundárias) e situam-se em duas categorias: amino-ésteres ou amino-amidas. Estas drogas são constituídas de uma porção aromática unida

por uma ligação éster (procaína) ou amida (lidocaína) a uma cadeia lateral básica, e apresentam a seguinte estrutura molecular básica - **Figura 1** (BIANCONI, 1998; ALVES e GUANAIS, 2002).

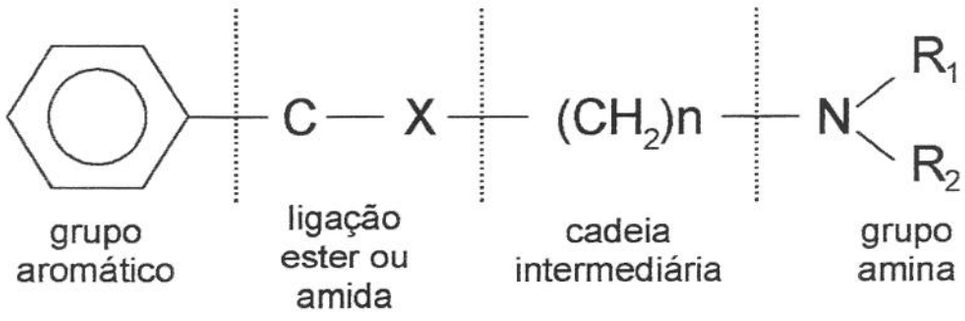


Figura 1- Estrutura molecular dos Anestésicos Locais

Todos os três componentes são importantes determinantes da atividade anestésica local da droga. A parte aromática confere propriedades lipofílicas à molécula, enquanto o grupo amina é responsável pela hidrossolubilidade. A cadeia intermediária é importante em dois aspectos: o primeiro, mostra a separação espacial necessária entre as extremidades lipofílicas e hidrofílicas; o segundo, a ligação química entre a cadeia de hidrocarboneto central e a porção aromática serve de base adequada para a classificação da maioria dos anestésicos locais em dois grupos, os ésteres (-COO-) e as amidas (-NHCO-) (YAGIELA, 1983).

Em 1905, **EINHORN E BRAUN**, relataram a síntese da procaína **(Figura 2)**, um éster do acido para-aminobenzóico. Substância suficientemente hidrossolúvel em solução, possuindo uma margem de segurança local e sistêmica aceitável para uso em anestesia regional. Até meados do século XX, a maioria dos compostos anestésicos locais era derivado do ácido para-amenobenzóico, e apresentavam como grande desvantagem a tendência de desencadear reações alérgicas, ou tipo sensibilização (STRICHARTZ e COVINO, 1993; MORGAN e MIKHAIL, 2003).

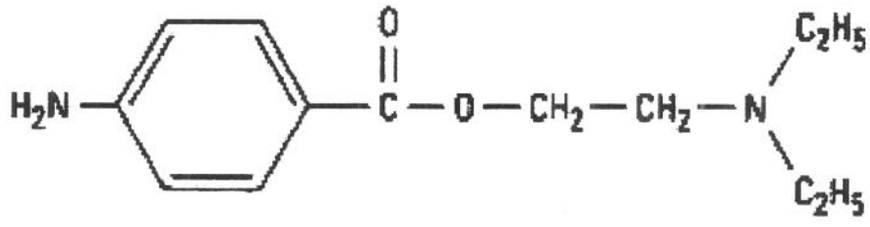


Figura 2- Estrutura molecular da procaína

Um grande avanço no estudo dos anestésicos locais ocorreu em 1943, com a síntese da lidocaína **(Figura 3)** por LÖFGREN. Consiste de uma amida derivada do ácido dietilaminoacético, que tem como grande vantagem, a ausência ou mínima propriedade de causar reações de sensibilidade (COVINO, 1973; STRICHARTZ e COVINO, 1993; MORGAN e MIKHAIL, 2003).

Comparada à procaína, a lidocaína tem efeito mais intenso, início mais rápido, maior duração de ação, com potência e toxicidade duas vezes maior (CARMICHAEL, 1991).

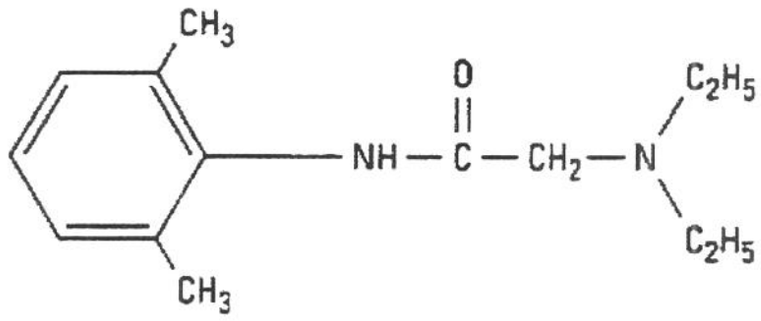


Figura 3- Estrutura molecular da lidocaína

1.2- Efeitos dos anestésicos locais sobre a placa motora

Para alguns autores os efeitos diretos dos anestésicos locais sobre placa mioneural, são questionados, no entanto admitem sua influência na ação dos bloqueadores neuromusculares não despolarizantes, intensificando e prolongando o bloqueio ocasionado por estes agentes (CORBETT e LORENZO, 1973). Isto pode dever-se a depressão da contração da fibra muscular, em decorrência da propriedade estabilizadora de membranas excitáveis, apresentada por estas drogas.

BOWMAN et al (1970) relatou que os anestésicos locais estabilizam todas as membranas potencialmente excitáveis, incluindo as células nervosas, musculares e secretoras, além de bloquearem a condução por inibição do aumento transitório na permeabilidade das membranas excitáveis para os íons sódio, processo necessário para a geração e propagação do potencial de ação.

ZANINI E OGA (1989) descreveram que grande número de drogas atuam no músculo estriado, como por exemplo a toxina botulínica, a cafeína e os anestésicos locais. O mecanismo de bloqueio da transmissão neuromuscular pode ter lugar na própria terminação nervosa (pré-sinaptico) ou após a liberação do mediador químico (pós-sináptico).

Muito se tem estudado sobre o mecanismo de ação dos anestésicos locais na junção neuromuscular, relatando-se que em baixas doses deprimem a facilitação pós-tetânica, refletindo um efeito pré-sináptico, e com doses maiores, bloqueiam as contrações musculares induzidas pela acetilcolina, sugerindo um efeito estabilizante na membrana subsináptica (USUBIAGA e STANDAERT, 1968; KORDAS, 1970). Além disso, os anestésicos locais possuem um efeito direto na membrana muscular provocando, em músculos desnervados ou curarizados, diminuição na força de contração em resposta a estímulos isolados (GELSER e MATSUBA, 1951; STRICHARTZ e COVINO, 1993). Também existem evidências de que estes agentes exercem ações nas membranas pré, pós-juncionais e musculares, potencializando o bloqueio neuromuscular causado

pelos bloqueadores neuromusculares (STRICHARTZ e COVINO, 1993; MARTINS e MARTINS, 1997).

Quando empregados isoladamente, somente em altas doses, a maioria dos anestésicos locais podem bloquear a transmissão neuromuscular, no entanto, podem potencializar o bloqueio neuromuscular produzido tanto por bloqueadores neuromusculares não despolarizantes quanto pelos despolarizantes, mesmo quando administrados em baixas doses (USUBIAGA e STANDAERT, 1968; TELIVUO e KATZ, 1970; ALVES e GUANAIS, 2002).

Estudos realizados em pacientes parcialmente paralisados com nortoxiferina, demonstraram que o emprego simultâneo de alguns anestésicos locais como a lidocaína, mepivacaína, prilocaína e bupivacaína, resultou em diminuição na altura das respostas musculares e no volume corrente (TELIVUO e KATZ, 1970). Outros estudos demonstraram que estas drogas administradas como agentes antiarrítmicos durante ou no pós-operatório, ou como agente anestésico em bloqueio espinhal ou mesmo por via venosa para atenuar as respostas reflexas decorrentes das manobras de laringoscopia e intubação traqueal, podem aumentar o bloqueio neuromuscular residual ou potencializar os efeitos dos bloqueadores neuromusculares (TOFT et al, 1990; STRICHARTZ e COVINO, 1993; TAIVAINEN et al, 1994; NONAKA et al, 2002; MUNAKATA et al, 2004; CARDOSO et al, 2005).

Alguns autores afirmam que os anestésicos locais devido ao bloqueio da condução nervosa, podem interferir com a transmissão neuromuscular, embora não existam evidências de que eles inibam a síntese de acetilcolina, em baixas concentrações reduzem a amplitude, sem alterar a freqüência do potencial de placa terminal em miniatura. Assim, a influência do anestésico local sobre esses parâmetros indica que eles diminuem a liberação da acetilcolina ou diminuem a sensibilidade da membrana pós-juncional para a acetilcolina (MATSUO et al, 1978).

A influência da procaína na liberação de aceticolina foi estudada por HARVEY (1939), evidenciando sua ação em ramificações do terminal nervoso motor. Esse seria o mais provável local de ação, uma vez que o menor diâmetro destas terminações poderia contribuir para a maior sensibilidade aos anestésicos locais. Este efeito atribuído às propriedades anestésicas locais, também foi observado com a cocaína, em preparação nervo frênico - diafragma do rato (BULBRING, 1946).

Para VITAL BRAZIL (1973) a procaína provoca bloqueio da transmissão do influxo nervoso na junção mioneural, sendo este mais evidente com a procainamida, efeito posteriormente confirmado por MATSUO et al (1978).

HIRST e WOOD (1971) estudaram a ação da procaína na preparação nervo frênico - diafragma isolado de ratos submetida a baixas freqüências de estimulação e relataram resposta semelhante a produzida pela d-tubocurarina, concluindo assim que esse efeito resulta de alteração na sensibilidade da membrana pós-juncional ao neurotransmissor, e não em sua liberação. No entanto, a estimulação do nervo frênico com altas freqüências produz redução na excitabilidade elétrica do nervo terminal, com ausência de resposta. Esta pode ser considerada uma distinta forma de depressão pré-juncional, resultado já relatado anteriormente por STRAUGHAN (1961). Assim permanece a hipótese de que o aumento da freqüência de estimulação, intensifica a ação da procaína na liberação de acetilcolina. Portanto, o bloqueio neuromuscular causado pela procaína é atribuído a ação tipo curarizante, mas diferenças qualitativas entre a ação do curare e a da procaína na junção neuromuscular, sugerem que a procaína pode também interferir com a liberação da acetilcolina do terminal nervoso motor durante altas freqüências de estimulação nervosa (KRNJEVIC e MILEDI, 1958; CATERRAL e MACKIE,1996).

O aumento do período refratário absoluto e a depressão da atividade pós-tetânica repetitiva, causados pelos anestésicos locais podem também ser atribuídos a esses efeitos pré-sinápticos (MATSUO et al, 1978).

Estudos eletrofisiológicos da ação da procaína sobre a preparação nervo-músculo de anfíbios sugeriram que a paralisia causada pelo anestésico local pode dever-se a uma ação pós-juncional e que a procaína é capaz de reduzir a sensibilidade da placa terminal para a acetilcolina, aplicada eletroforeticamente (FURUKAWA, 1957).

MAENO (1966) mostrou que concentrações de procaína capazes de reduzir a amplitude do potencial de placa terminal em miniatura (PPTM) não exerciam efeito sobre a liberação do transmissor do terminal nervoso. Isso foi posteriormente sustentado por HIRST e WOOD (1971) que relataram que a redução na sensibilidade a acetilcolina, causada pela procaína é fortemente evidenciada pela depressão na amplitude dos PPTM. Adicionalmente, o rápido aparecimento da depressão e a rápida reversibilidade mostra de alguma forma que não existe mudança no tamanho do quanta do transmissor liberado. Em outros experimentos, utilizando técnicas de registros intracelulares, estes autores demonstraram que drogas que deprimem a síntese do neurotransmissor, tem seus efeitos observados, somente após longos períodos de estimulação.

Assim, a evidência de que a procaína em altas concentrações causa paralisia unicamente pelo efeito pós-juncional, seria devido ao fato de afetar a transmissão neuromuscular de maneira semelhante a d-tubocurarina com exceção no tempo do curso dos potenciais de placa terminal (pptm). O efeito pós-juncional pode ser atribuído a interferência com o receptor ocupado pelo transmissor ou com a mudança no potencial de equilíbrio do transmissor (MAENO,1966).

NEHER e STEIBACH (1978), relataram que a procaína também atua bloqueando canais iônicos, previamente abertos pela acetilcolina, tornando-os não condutivos e ocasionando rápido decréscimo de fase em potenciais de placa terminal e potenciais de placa terminal em miniatura. O bloqueio repetitivo e o desbloqueio dos canais produzem um longo prolongamento na corrente até finalmente o fechamento do canal.

GAGE et al (1983) estudaram os locais de ação da procaína na placa terminal motora para avaliar o decréscimo de potenciais de placa terminal em miniatura nas fibras musculares do sartório do sapo (Bufo marinus). O experimento foi realizado com soluções hipertônicas, técnicas de voltage-clamp utilizando eletrodos extracelulares, para aumentar a freqüência de potenciais de placa terminal em miniatura. Os resultados indicaram que a procaína ocupa o canal iônico, ligando-se de maneira similar aos dois lados da membrana.

Estudos realizados anteriormente descreveram que na junção neuromuscular, a hiperpolarização aumenta o efeito da procaína, assim como o da galamina, do decametônio, do hexametônio, da atropina, da escopolamina. Como essas drogas são carregadas positivamente em pH fisiológico, o movimento da droga dentro do canal parece ser evidenciado no interior da fibra que é carregada mais negativamente (KORDAS, 1970; MAENO et al, 1971; ADLER et al, 1978; KATZ e MILEDI, 1978; MILNE e BIRNE, 1981).

KATZ e MILEDI (1978), no entanto relataram que a procaína age no lado externo da membrana para bloquear canais previamente ativados pela acetilcolina. Estudos usando técnicas de voltagem-clamp e registros intracelulares também mostraram que os anestésicos locais podem bloquear os canais iônicos da placa terminal e reduzir a corrente da placa terminal produzida pelos agentes despolarizantes como a acetilcolina e o carbacol (ADAMS, 1977; NEHER e STEINBACH, 1978).

Anteriormente alguns autores descreveram que a procaína, lidocaína e seus derivados deprimem e modificam a resposta dos receptores pós-sinápticos da junção neuromuscular para a acetilcolina e sugeriram que o local de ação destas substâncias é o mesmo da d-tubacurarina ou seja os receptores pós-sinápticos (MAENO, 1966; STEINBACH, 1968a; STEINBACH, 1968b).

A procaína apresenta efeito curariforme por diminuir a sensibilidade da membrana subsináptica à ação estimulante da acetilcolina e de maneira semelhante à lidocaína, por inibir a atividade da acetilcolinesterase, prolonga a duração da ação da succinilcolina ((VIANA, 1992; GORNIAK, 1999).

VIGBY-MOGENSEN et al (1985) relataram que a procaína e a lidocaína apresentam pouca atividade anticolinesterásica, o que ocorre é uma competição com a succinilcolina pela ligação as proteínas plasmáticas. A procaína sendo metabolizada pela pseudocolinesterase pode em altas doses comprometer a hidrólise da succinilcolina. E a lidocaína venosa utilizada no tratamento de disritmias cardíacas pode aumentar a incidência de bloqueio fase II da succinilcolina (MILLER, 1981).

WALI (1984) estudando os mecanismos de ação da lidocaína na preparação músculo biventer cervicis de aves, observou que alem da redução na resposta induzida pela acetilcolina, que pode dever-se ao bloqueio dos canais iônicos da placa terminal, responsáveis pela despolarização da membrana, o anestésico local provocava contratura muscular e aumentava a contratura produzida pelo agente despolarizante tetraetilamônio. A contratura poderia ser atribuída a uma ação da lidocaína sobre a liberação do Ca^{++}, em adição ao bloqueio dos canais iônicos de sódio e potássio em membranas do nervo e do músculo. A potencialização da contratura induzida pelo tetraetilamônio, seria decorrente da capacidade dos dois agentes em aumentar a concentração dos íons cálcio proveniente do retículo sarcoplasmático ou em bloquear a recaptação deste íon para o interior do retículo sarcoplasmático.

Estudo correlacionando a estrutura molecular de vários derivados da lidocaína com as suas respectivas propriedades inibitórias da transmissão neuromuscular e com sua potência anestésica local, demonstrou que as propriedades moleculares relacionadas com o comprometimento da transmissão neuromuscular, são similares aquelas envolvidas na ativação de receptores de acetilcolina, e não com as associadas a sua potencia anestésica local. Esses resultados podem sugerir que a lidocaína produz bloqueio neuromuscular por mecanismo distinto do seu mecanismo de ação como anestésico local. A lidocaína pode portanto bloquear completamente a condução nervosa e também deprimir a condução do impulso ao nível pré e pós-juncional (STEINBACH, 1968a; STEINBACH, 1968b).

1.3- Farmacologia dos bloqueadores neuromusculares: d-Tubocurarina e Rocurônio

Os bloqueadores neuromusculares (BNM) são fármacos amplamente utilizados na prática anestésica. Apresentam em sua estrutura um ou mais grupos de amônio quaternário, carregados positivamente, que se ligam as subunidades alfa do receptor nicotínico na placa motora, mimetizando a ação da acetilcolina causando despolarização antes da paralisia ou impedindo o acesso da acetilcolina ao receptor evitando a despolarização (HUNTER, 1995; TAYLOR, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006).

No Brasil, o interesse pelos curarizantes ocorreu ainda na década de 1940. No campo da farmacologia, VITAL BRAZIL et al (1944), publicaram os primeiros resultados de suas pesquisas com os alcalóides solúveis do *Chondodendron platyphilum*. Já na área clínica, a primeira anestesia em que foi empregado o curare, foi realizada por PATURY E SOUZA, em 1945, que utilizaram o intocostrin, em paciente submetido a anestesia geral com ciclopropano (DUARTE, 2000).

Desde a introdução da d-tubocurarina, na década de 40, e até a década de 80, no século XX, muitas moléculas novas foram desenvolvidas surgindo uma série de bloqueadores neuromusculares, do tipo adespolarizante, sintéticos, com grande potencialidade para o uso clínico, resultantes de pesquisas que se concentram em duas grandes famílias: os benzilisoquinoleínicos e os aminoesteróides. No grupo dos benzilisoquinoleínicos se encontram a d-tubocurarina, a metocurina, o alcurônio, o atracúrio, o cisatracúrio e o mivacúrio, e no grupo dos aminoesteróides se destacam o rocurônio, pancurônio e o vecurônio.(WAUD, 1984; HUNTER, 1995; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006).

A d-tubocurarina **(Figura 4)** constitui o protótipo dos benzilisoquinoleínicos, com interesse histórico e uso em pesquisas experimentais. É um bloqueador com potência relativamente baixa (DE_{95} = 0,5mg.kg^{-1}), longa

duração de ação e efeitos colaterais, decorrentes da ação bloqueadora ganglionar e da liberação de histamina (BELMONT et al, 1993; ARAÑÓ et al, 2000; SEPULVEDA, 2000).

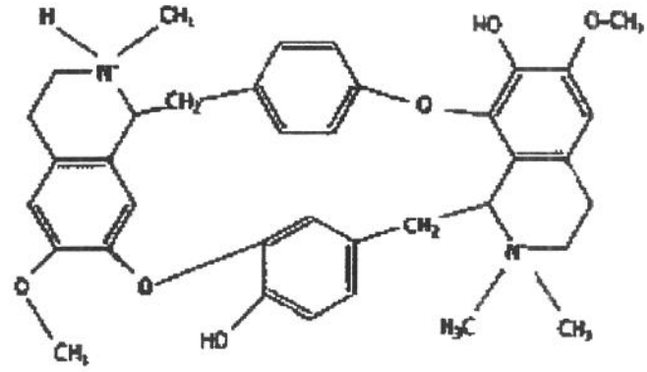


Figura 4- Fórmula estrutural da d-tubocurarina

O rocurônio **(Figura 5)** é um bloqueador neuromuscular aminoesteróide não despolarizante de estrutura química e perfil farmacocinético similar ao vecurônio, caracterizado principalmente pela duração de ação intermediária. Tem como grande vantagem, rápido início de ação, o que o diferencia dos demais bloqueadores adespolarizantes, constituindo uma alternativa ao uso de succinilcolina em procedimentos de indução e intubação de seqüência rápidas (COOPER et al, 1992; LIEN et al, 1994; FURTADO et al, 1997; SPARR et al, 2001; CARDOSO et al, 2005).

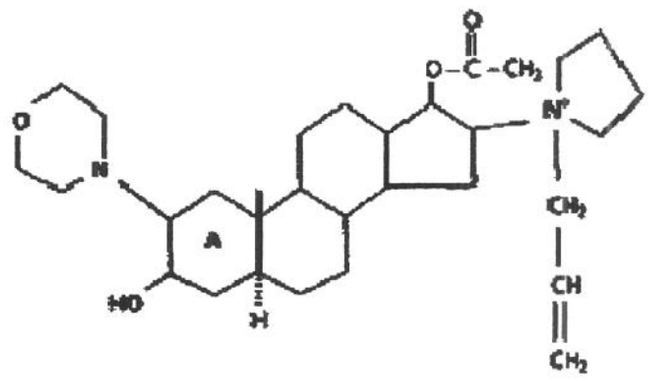


Figura 5- Fórmula estrutural do rocurônio

1.4- Interação anestésicos locais – bloqueadores neuromusculares

YORUKOGLU et al (2003) estudaram as condições de intubação traqueal após a administração de rocurônio e da succinilcolina isoladamente, da associação rocurônio-lidocaína, e obtiveram com o grupo da associação, resultados semelhantes aos do grupo que recebeu succinilcolina, que foram significativamente melhores em relação ao uso isolado do rocurônio.

As propriedades farmacológicas dos bloqueadores neuromusculares (BNM), tais como inicio de ação, o grau de bloqueio neuromuscular e a duração de ação dependem de vários fatores. Estes incluem o débito cardíaco, o tempo circulatório para o músculo, o fluxo sanguíneo muscular, afinidade pelo local de ação, potência e dose administrada (DONATI, 1988).

A interação entre os anestésicos locais e os bloqueadores neuromusculares não está completamente elucidada, e vários mecanismos podem ser responsáveis pela potencialização dos efeitos dos relaxantes musculares pelos anestésicos locais. Teoricamente estas drogas podem interferir em alguma etapa envolvida na transmissão neuromuscular. Pré-sinápticamente, os anestésicos locais deprimem seletivamente a condução nas fibras terminais motoras e diminuem a liberação de acetilcolina durante estimulação nervosa e pós-sinápticamente podem se ligar a diferentes sítios específicos de acetilcolina resultando em dessensibilização desses receptores, além de causar estabilização da membrana subsináptica, interferir com o mecanismo de excitação-contração da fibra muscular e também poder ocluir transitoriamente os canais dos receptores nicotínicos (STRAUGHAN, 1961; USUBIAGA e STANDAERT, 1968; MATSUO et al, 1978; NEHER e STEINBACH, 1978; SINE e TAYLOR, 1982; TARDELLI, 2001)

Embora somente em altas doses os anestésicos locais possam comprometer a transmissão neuromuscular, trabalhos apontam para possível interação destas drogas com os bloqueadores neuromusculares, potencializando os efeitos destes últimos, particularmente os adespolarizantes, com relevância

clínica e necessidade de cuidadosa observação quando do emprego simultâneo destas drogas, ou em situações em que a margem de segurança da transmissão neuromuscular estiver reduzida.

2- OBJETIVOS

2.1- Geral

Avaliar os efeitos dos anestésicos locais procaína e lidocaína sobre a transmissão neuromuscular e a sua influência no bloqueio neuromuscular produzido por diferentes bloqueadores neuromusculares.

2.2- Específicos

Avaliar a influência da procaína e da lidocaína sobre o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina e pelo rocurônio;

Avaliar os efeitos da procaína e da lidocaína sobre o potencial de membrana do músculo esquelético e sobre os potenciais de placa terminal em miniatura;

Avaliar a influência da procaína e da lidocaína sobre a ação contraturante da acetilcolina;

Avaliar a eficácia da neostigmina e da 4-aminopiridina no antagonismo do bloqueio neuromuscular induzido pela associação anestésicos locais (procaína e lidocaína) - bloqueadores neuromusculares (d-tubocurarina e rocurônio).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais utilizados

Após aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA - IB - UNICAMP (Protocolo nº 885-2 - Anexo 1) e seguindo-se as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - Anexo 2), foram utilizados ratos da linhagem Wistar fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp, Campinas (SP) e pintainhos da linhagem HYLINE W36, fornecidos pela granja ITO S/A, Sumaré (SP).

Os animais foram mantidos em gaiolas e tratados com água e ração ad libitum.

3.2- Fármacos e concentrações utilizadas

Os fármacos e as respectivas concentrações utilizadas nos experimentos foram as seguintes:

Anestésicos locais: procaína (40 μg/mL)

lidocaína (20 μg/mL)

Bloqueadores neuromusculares: d-tubocurarina (0,3μg/mL)

rocurônio (4μg/mL)

Colinérgico: acetilcolina (5 μg/mL)

Anticolinesterásico: neostigmina (2 μg/mL)

Bloqueador de canais de potássio: 4-aminopiridina (20 μg/mL)

3.3- Estudos miográficos

3.3.1- Preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato (NFD)

Esta preparação foi utilizada para avaliar o efeito dos anestésicos locais (procaína e lidocaína) na transmissão neuromuscular e sua influência no bloqueio neuromuscular causado pelos bloqueadores neuromusculares adespolarizantes (d-tubocurarina e rocurônio).

A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por BULBRING (1946).

Foram utilizados ratos com peso entre 250 e 300g, para a retirada do hemidiafragma esquerdo e a porção do nervo frênico correspondente.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico ($40mg.kg^{-1}$) por via intraperitoneal e em seguida foram exsanguinados por secção dos vasos do pescoço, para facilitar a identificação do nervo frênico.

Foi retirado o músculo diafragma juntamente com o nervo frênico e parte das costelas (para fixação no suporte do eletrodo). O conjunto foi mergulhado em solução nutritiva de Tyrode com borbulhamento de carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2) e temperatura constante de 37°C. A solução nutritiva de Tyrode tem a seguinte composição em mM: NaCl- 137; NaH_2PO_4- 0,3; $CaCl_2$- 1,8; KCl- 2,7; glicose- 11,0; $MgCl_2$- 0,25; $NaHCO_3$- 11,9; água destilada 1000mL. Os experimentos foram iniciados após a estabilização sob estas condições durante 30 minutos.

O músculo de forma triangular foi fixado por sua base em suporte apropriado, o qual permite através de eletrodos de platina estimular o nervo ou diretamente o músculo, cuja tensão é de 2,0 g/cm para registro das contrações musculares. Um eletrodo bipolar foi colocado em torno do nervo frênico para a estimulação indireta através de um estimulador GRASS modelo S88. A preparação montada com o eletrodo fica suspensa em um suporte universal

dentro de uma cuba de vidro com fundo poroso (para a aeração da solução com carbogênio) com 40mL de solução de Tyrode.

Foram aplicados estímulos retangulares supramaximais indiretos com 0,2ms de duração, 0,1 Hz de freqüência e intensidade entre 0,5 a 5V. Os registros da amplitude das contrações foram feitos através de transdutores conectados a um fisiógrafo GOULD modelo RS 3400 **(Figura 6).**

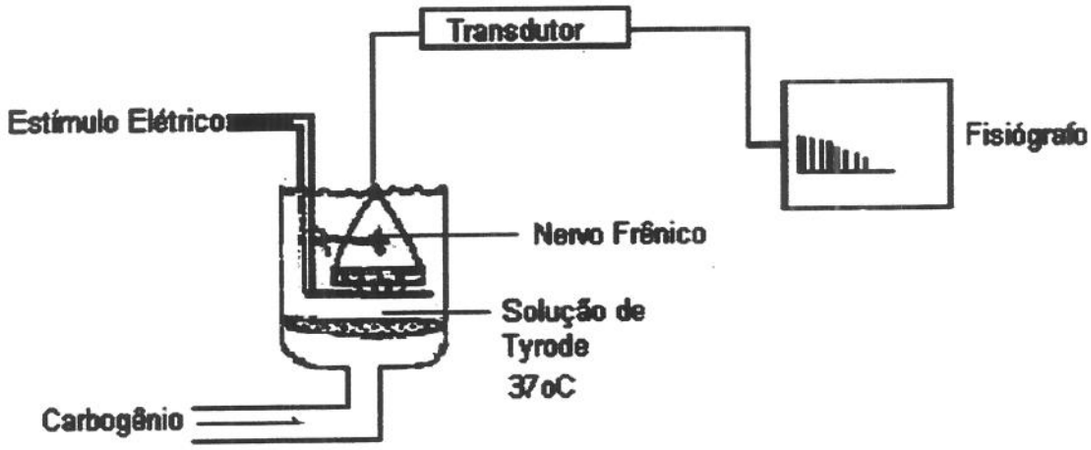


Figura 6- Esquema da Preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

3.3.2- Influência dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína na transmissão neuromuscular e no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina e rocurônio

Os experimentos seguiram o seguinte protocolo: após a estabilização da preparação iniciou-se estimulação elétrica do nervo frênico por 3 minutos e registro da resposta controle; adição dos anestésicos locais procaína (40μg/mL) e lidocaína (20 μg/mL); registro das respostas durante 60 minutos. Nos experimentos em que se estudou a associação anestésico local - bloqueador neuromuscular, a d-tubocurarina (0,3μg/mL) e o rocurônio (4μg/mL) foram adicionados a preparação, após 30 minutos de exposição ao anestésico local, e as

respostas registradas durante 60 minutos. Para análise dos dados considerou-se a amplitude das respostas musculares antes e após a adição do bloqueador neuromuscular a preparação.

Para avaliação da eficácia da neostigmina (2μg/mL) e da 4-aminopiridina (20μg/mL) na reversão do bloqueio neuromuscular, estes fármacos foram adicionados a preparação após o registro do bloqueio neuromuscular obtido aos 60 minutos.

3.3.3- Influência dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína sobre a ação contraturante da acetilcolina - Preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado

Este procedimento foi realizado segundo técnica descrita por VITAL BRAZIL (1965), com o objetivo de se observar a ação pós-sináptica dos fármacos em estudo ou uma possível ação ao nível da fibra muscular.

O procedimento iniciou-se após a anestesia do rato com halotano, posicionando-o em decúbito lateral direito, seguindo-se a desnervação. Realizou-se incisão de 0,5cm perpendicular à linha mediana do terço inferior da região lateral do tórax esquerdo. A incisão compreende a pele e a camada muscular que recobre a região. Com extensão de aproximadamente 1,5cm cortaram-se os músculos intercostais e com um bastão de vidro com extremidade recurvada, prendeu-se e seccionou-se o nervo frênico. Suturou-se a pele por meio de dois pontos. Após 15 a 20 dias retirou-se o hemidiafragma esquerdo adotando-se a técnica descrita para nervo frênico-diafragma de rato (BULBRING, 1946).

A montagem da preparação, a solução nutritiva, o borbulhamento com carbogênio e o protocolo de registro das contrações do músculo desnervado foram iguais aos descritos na técnica anterior.

Com auxílio de um estimulador Grass S88, foram aplicados diretamente no músculo estímulos supramaximais de 2ms de duração e 0,1Hz de freqüência, durante 3 minutos para obtenção das respostas musculares (controle); após esse período suspendeu-se à estimulação e adicionou-se na preparação, acetilcolina (5μg/mL), registrando-se a curva resposta. Quando a contratura atingiu o seu ápice, interrompeu-se o registro do fisiógrafo e a preparação foi lavada com solução nutritiva Tyrode (três sucessivas lavagens), e os anestésicos locais procaína (40μg/mL) ou lidocaína (20μg/mL) foram adicionados separadamente à preparação, aguardou-se 30 minutos. Após esse período foram aplicados estímulos elétricos diretos durante três minutos para obtenção de um outro controle das respostas musculares; a seguir interrompeu-se a estimulação e adicionou-se novamente a acetilcolina (5μg/mL) registrando-se a segunda curva. O grau de contratura à acetilcolina foi comparado antes e após a adição da procaína ou da lidocaína.

3.3.4- Influência dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína sobre a ação contraturante da acetilcolina - Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho

A preparação foi montada de acordo com o método descrito por GINSBORG e WARRINER (1960). Foram utilizados pintainhos de 4 a 8 dias de idade com peso entre 40 e 80g.

Os pintainhos foram anestesiados com halotano por via inalatória e depois se retirou o músculo *biventer cervicis*, o qual ficou suspenso em cuba de 5mL contendo a solução nutritiva de Krebs. A solução nutritiva de Krebs apresenta a seguinte composição em mM: NaCl - 136; KCl - 5; $CaCl_2$ - 2,5; $MgSO_4$ - 1,2; KH_2PO_4 - 1,2; $NaHCO_3$ - 23,8; glicose - 2 em água destilada 1000mL. A preparação foi aerada com borbulhamento de carbogênio (95% de O_2 e 5% de CO_2) e a temperatura foi mantida em 37°C.

Com estimulador GRASS modelo S88, aplicou-se estímulos indiretos supramaximais, com 0,1 Hz de freqüência, 0,2 ms de duração e intensidade de 4 a 9V. A tensão dada ao músculo foi de 0,5g/cm. As contrações foram registradas em um fisiógrafo GOULD modelo RS3400, usando-se transdutores isométricos modelo load Cell BG 50MS (Kulite Semiconductor Product Inc). Como na preparação nervo frênico - diafragma de rato cronicamente desnervado, as preparações *biventer cervicis* de pintainho, também foram submetidas a um período de estabilização.

Foram feitos experimentos para a detecção da curva de acetilcolina (5μg/mL) antes e depois da adição dos anestésicos locais: procaína (40μg/mL) e lidocaína (20μg/mL) isoladamente e seguindo o mesmo protocolo realizado com a preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado.

3.4- Estudos eletrofisiológicos

Utilizou-se a preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato segundo a técnica de BULBRING (1946) para a observação dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTMs) e potenciais de membrana (PM).

3.4.1- Montagem da preparação e confecção dos microeletrodos (Me)

O músculo diafragma depois de retirado foi estendido e fixado horizontalmente com a superfície torácica voltada para cima e fixada com alfinetes em uma cuba de 10 cm de comprimento, 5 cm de largura e 2 cm de altura. A cuba foi preenchida com 30mL de solução nutritiva de Tyrode, sendo a oxigenação da preparação feita pelo borbulhamento com carbogênio. A preparação manteve-se à temperatura de 37°C.

Para a captação dos PPTMs, o microeletrodo foi implantado junto ou o mais próximo possível da região da placa motora terminal (FATT e KATZ, 1951), utilizando-se um microscópio esteroscópio para auxiliar a localização da placa motora. O registro dos PPTM feito pelo osciloscópio foi fotografado com câmera oscilloscope modelo C-5A.

3.4.2- Descrição do circuito

Os potenciais elétricos foram captados através de microeletrodo de vidro preenchido com solução de KCl (3M). O microeletrodo com resistência de 5 a 20 MΩ foram preparados no laboratório e conservados em geladeira. Para sua confecção, utilizou-se tubos de vidro (capilares de vidro Clark que continham microcapilar interno para facilitar o preenchimento com KCl) e um estirador de microeletrodo Microelectrode Puller (Palmer).

Depois foram fixados na parte antero-posterior de um suporte através de um tubo de aço inox com orifício central suficiente para a introdução do macroeletrodo (Me), junto com um anel de vedação de polietileno. Na parte póstero-inferior do suporte, sai um fio condutor que se une a um seguidor catódico através de um filamento de mercúrio. A conexão entre o microeletrodo e o fio condutor foi feita através de um vaso comunicante preenchido com KCl (3M). Na extremidade superior do suporte os orifícios do vaso comunicante foram vedados por uma lamínula, mediante a uma camada de vaselina sólida. O suporte foi fixado ao braço de um micromanipulador JENA acoplado ao microscópio-estereoscópio ZEISS para aumento de até 40 vezes.

Este equipamento permite realizar deslocamentos horizontais e verticais controlando a introdução do Me nas fibras musculares, para as medidas dos potenciais de membrana e captação dos PPTMs.

O seguidor catódico foi posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conectado ao canal do osciloscópio TEKTRONIK 5.103N com módulos 5A22N e 5B12N.

O eletrodo indiferente, constituído por um tubo de vidro curvo preenchido com agar, mantém-se mergulhado de um lado no mercúrio e no outro a solução nutritiva de Tyrode. É ligado por meio de um fio condutor a um gerador de impulsos capaz de fornecer sinais de 100, 20, 5 e 0,2 mV. A preparação e a aparelhagem empregadas permaneceram no interior de uma gaiola de Faraday, para evitar interferências no registro feito pelo osciloscópio **(Figura 7).**

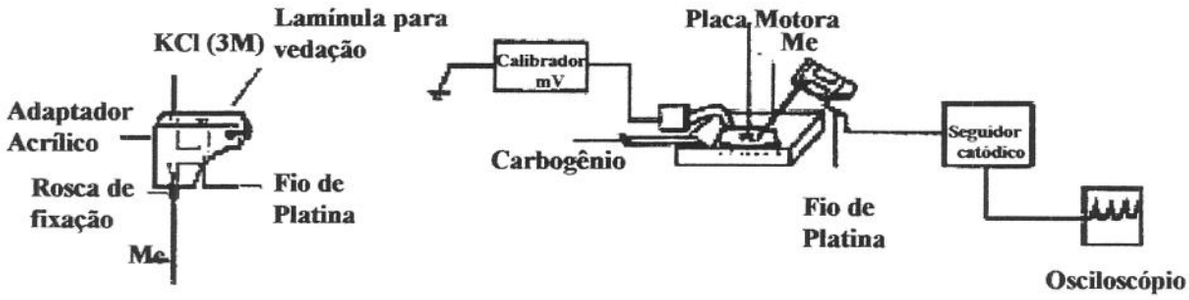


Figura 7- Microeletrodo e montagem de aparelhagem para os experimentos eletrofisiológicos

3.4.3- Medida da resistência do microeletrodo

Após o encaixe do Me no suporte, fixou-se o conjunto no braço do micromanipulador, ligando-se o fio condutor ao seguidor catódico.

Procedeu-se a medida da resistência do Me, colocando-o na solução nutritiva e introduzindo-se, em paralelo no circuito, uma resistência de valor conhecido. Foram desprezados os microeletrodos cuja resistência não estivesse compreendida entre 5 e 20 m Ω.

3.4.4- Influência dos anestésicos locais: Procaína e Lidocaína nos Potenciais de Membrana (PM)

Para a determinação do potencial de membrana (potencial de repouso) das fibras musculares, com auxílio de microscópio inseriu-se o microeletrodo intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais (em regiões distantes da placa motora) e mediu-se o deslocamento vertical sofrido pelo feixe do osciloscópio, no momento da inserção.

Foram medidos cinco potenciais de membrana em cada tempo determinado obtendo-se uma média, sendo que no tempo zero, os potenciais foram medidos antes da administração dos anestésicos locais, considerando-os como controle. Após esta medida, adicionou-se separadamente a procaína (40μg/mL) e a lidocaína (20μg/mL) ao banho e procederam-se leituras aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Foram realizados cinco experimentos com cada anestésico local e calculou-se a média aritmética e o desvio padrão das leituras realizadas.

Determinou-se o potencial de membrana multiplicando-se o valor da média pelo fator de correção (fc) estabelecido aplicando-se ao circuito, um sinal de 100 mV e medindo-se a deflexão correspondente no osciloscópio.

3.4.5- Influência dos Anestésicos Locais: Procaína e Lidocaína nos Potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM)

Os potenciais de placa terminal em miniatura foram avaliados em hemidiafragma esquerdo de rato, com placa motora preservada. Nos experimentos, estudaram-se os efeitos da procaína e da lidocaína sobre a freqüência e a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura. Estes foram registrados antes (controle), 30 e 60 minutos após a adição da procaína (40μg/mL) e da lidocaína (20μg/mL).

3.5- Análise estatística

Os resultados foram apresentados como valores médios e desvios padrão. Para avaliar a redução das respostas musculares utilizou-se o teste de Mann-Whitney; a eficácia da neostigmina e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular, o efeito dos anestésicos locais na resposta contraturante da acetilcolina em preparação diafragma de rato cronicamente desnervado e *biventer cervicis* de pintainho, e a comparação dos potenciais de membrana antes e após a adição dos anestésicos locais em preparação diafragma de rato, foram avaliados através do teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Assumiu-se um nível de significância de 5% (α= 5%). O poder do teste foi calculado e obteve-se ß > 20% (poder > 80%). O software utilizado para análise dos dados foi o SAS versão 8.2.

4- RESULTADOS

4.1- Estudos miográficos

4.1.1- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) e dos Bloqueadores Neuromusculares (d-tubocurarina e rocurônio) nas respostas musculares em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

Os anestésicos locais (procaína e lidocaína) e a d-tubocurarina nas concentrações estudadas e empregadas isoladamente em preparações nervo frênico-diafragma de ratos, não causaram redução na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta **(Figuras 8, 9 e 10)**.

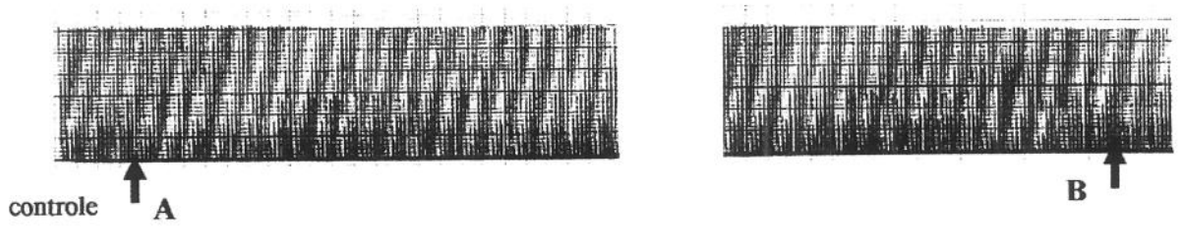


Figura 8- Efeito da procaína (40μg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). **A**: adição de procaína; **B**: 60 minutos após a adição da procaína

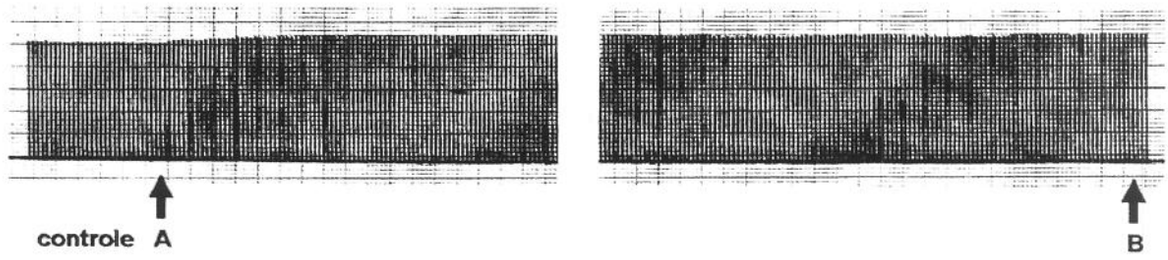


Figura 9- Efeito da lidocaína (20μg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). **A**: adição de lidocaína; **B**: 60 minutos após a adição de lidocaína

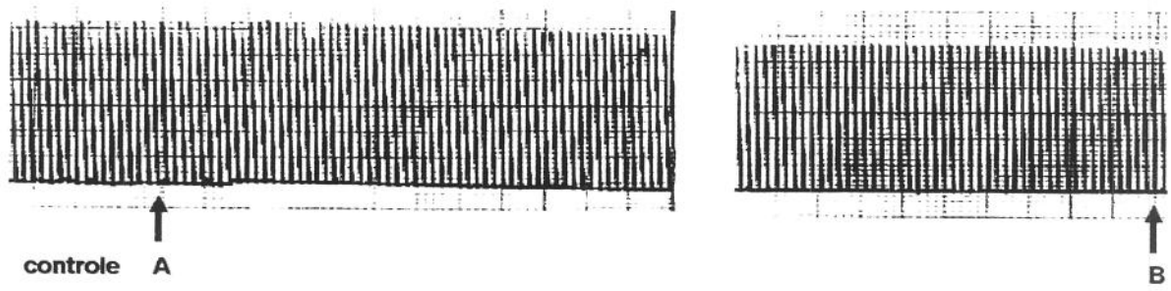


Figura 10- Efeito da d-tubocurarina (0,3μg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). **A**: adição de d-tubocurarina; **B**: 60 minutos após a adição de d-tubocurarina

O rocurônio (4μg/mL) empregado isoladamente produziu uma redução média de 57,8% ± 11,9 na amplitude das respostas musculares a estimulação indireta **(Figura 11).**

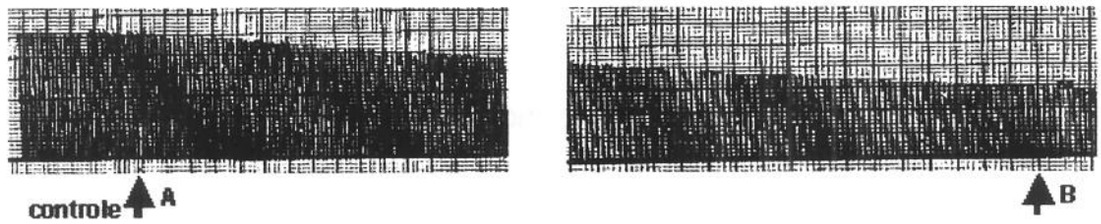


Figura 11- Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). **A**: adição de rocurônio; **B**: 60 minutos após a adição de rocurônio

4.1.2- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) no bloqueio neuromuscular produzido pelos Bloqueadores Neuromusculares (d-tubocurarina e rocurônio) em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

A d-tubocurarina (0,3μg/mL) em preparações expostas previamente à procaína (40μg/mL) promoveu redução de 75,2% ± 6,92 na amplitude das respostas musculares **(Figura 12) e (Tabela 3 - Anexo)**; nas expostas a lidocaína (20μg/mL) o bloqueio foi de 63,2% ± 4,60 **(Figura 13) e (Tabela 4 - Anexo).**

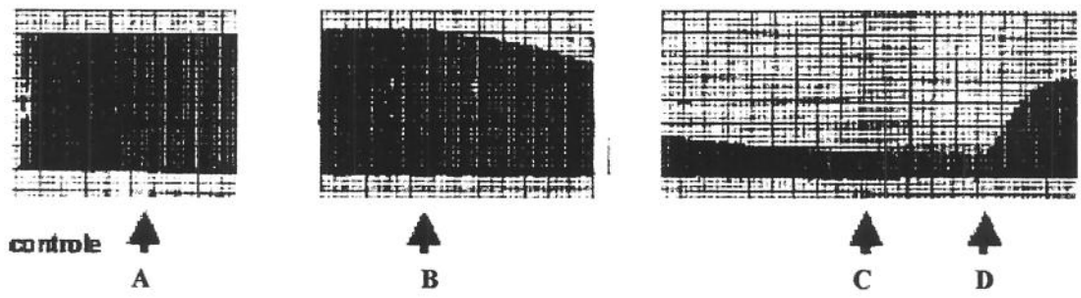


Figura 12- Efeito da d-tubocurarina (0,3μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas à procaína (40μg/mL). Efeito da neostigmina. **A**: adição de procaína; **B**: adição de d-tubocurarina, 30 minutos após exposição à procaína; **C**: 60 minutos após adição de d-tubocurarina; **D**: adição da neostigmina (2,0 μg/mL)

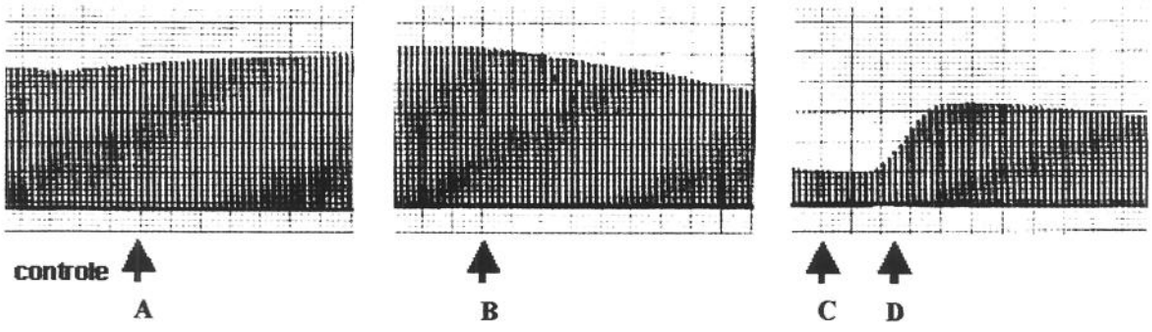


Figura 13- Efeito da d-tubocurarina (0,3μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas a lidocaína (20μg/mL). Efeito da neostigmina. **A**: adição de lidocaína; **B**: adição da d-tubocurarina, 30 minutos após exposição à lidocaína; **C**: 60 minutos após adição de d-tubocurarina; **D**: adição da neostigmina (2,0 μg/mL)

O bloqueio neuromuscular causado pela d-tubocurarina em preparações expostas à procaína e a lidocaína foi parcial e totalmente revertido pela neostigmina (2μg/mL) e pela 4-aminopiridina (20μg/mL), respectivamente **(Figuras 12, 13, 14 e 15).** A recuperação da amplitude das respostas musculares após a adição da neostigmina, nas preparações expostas a procaína foi cerca de 65,36% ± 11,79 e a lidocaína foi de 65,0% ± 9,40 **(Tabelas 5 e 6 - Anexo).**

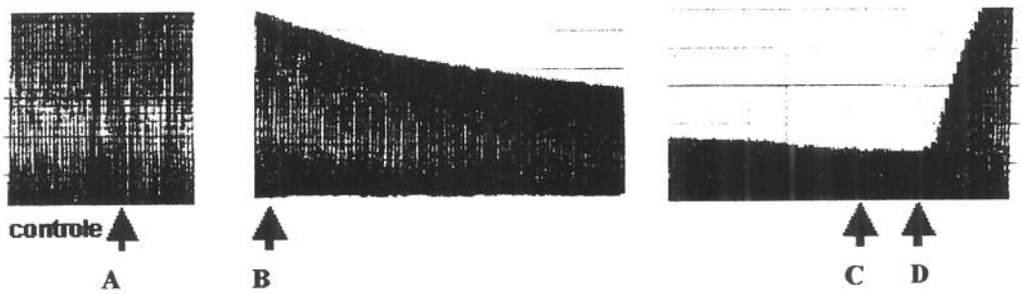


Figura 14- Efeito da d-tubocurarina (0,3μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas à procaína (40μg/mL). Efeito da 4 aminopiridina. **A**: adição de procaína; **B**: adição de d-tubocurarina, 30 minutos após exposição à procaína; **C**: 60 minutos após adição de d-tubocurarina; **D**: adição de 4-aminopiridina (20 μg/mL)

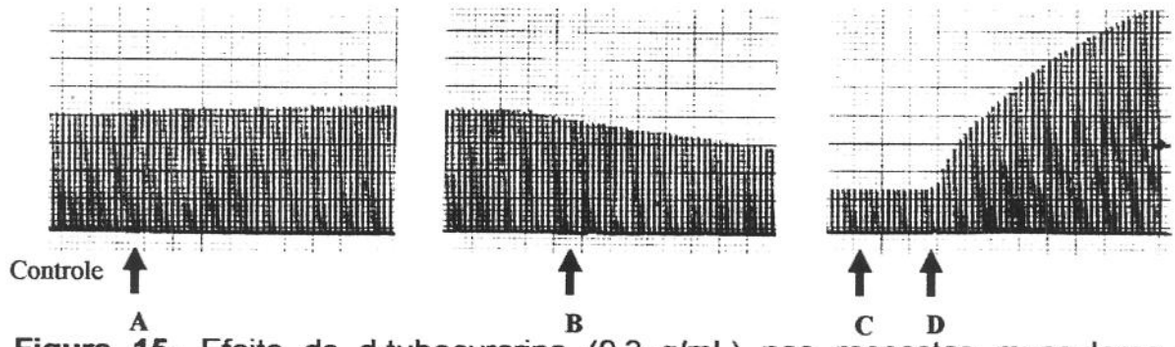


Figura 15- Efeito da d-tubocurarina (0,3μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas a lidocaína (20μg/mL). Efeito da 4 - aminopiridina. **A**: adição de lidocaína; **B**: adição de d-tubocurarina, 30 minutos após a lidocaína; **C**: 60 minutos após adição da d-tubocurarina; **D**: adição de 4-aminopiridina (20 μg/mL)

Nas preparações expostas a procaína e a lidocaína, os bloqueios produzidos pelo rocurônio foram de 75,51% ± 3,49 e 82,80% ± 1,91, respectivamente **(Figuras 16 e 17) e (Tabelas 7 e 8 - Anexo)**.

Figura 16- Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), nas preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas à procaína (40μg/mL). Efeito da 4 - aminopiridina. **A**: adição de procaína; **B**: adição de rocurônio, 30 minutos após a procaína; **C**: 60 minutos após adição de rocurônio; **D**: adição de 4-aminopiridina (20 μg/mL)

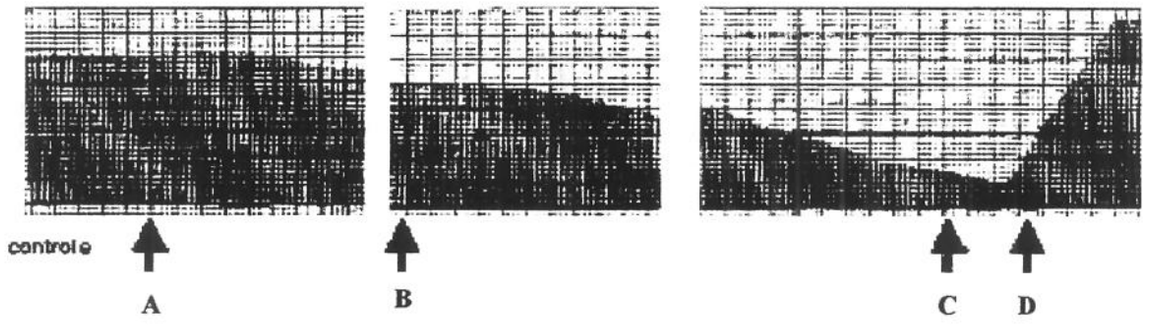


Figura 17- Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas a lidocaína (20μg/mL). Efeito da 4 - aminopiridina. **A**: adição de lidocaína; **B**: adição de rocurônio, 30 minutos após a lidocaína; **C**: 60 minutos após adição de rocurônio; **D**: adição de 4-aminopiridina (20 μg/mL)

O bloqueio neuromuscular causado pelo rocurônio em preparações expostas a procaína e a lidocaína foi parcial e totalmente revertido pela neostigmina (2μg/mL) e pela 4-aminopiridina (20μg/mL), respectivamente **(Figuras 16, 17, 18, e 19).** A recuperação da amplitude das respostas musculares, após a adição da neostigmina nas preparações previamente expostas a procaína foi cerca de 33,32% ± 4,08 e a lidocaína foi de 44,66% ± 5,05 **(Tabelas 9 e 10 – Anexo).**

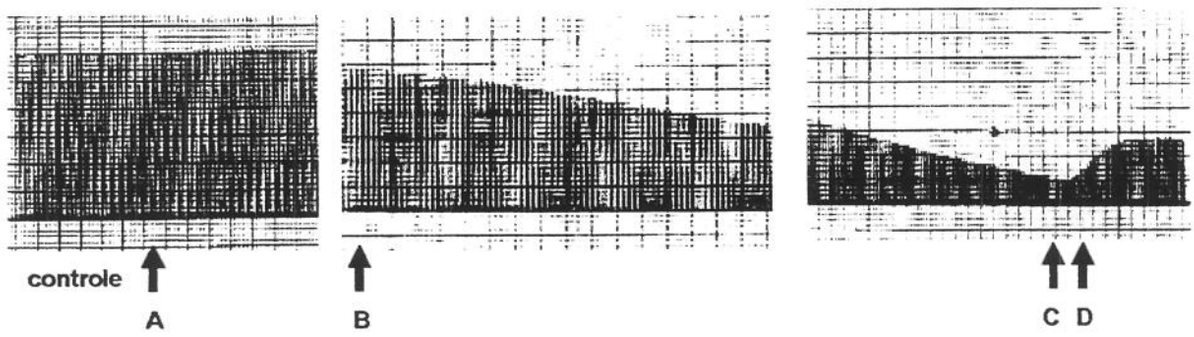


Figura 18- Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas à procaína (40μg/mL). Efeito da neostigmina. **A**: adição de procaína; **B**: adição de rocurônio, 30 minutos após a procaína; **C**: 60 minutos após adição de rocurônio; **D**: adição de neostigmina (2 μg/mL)

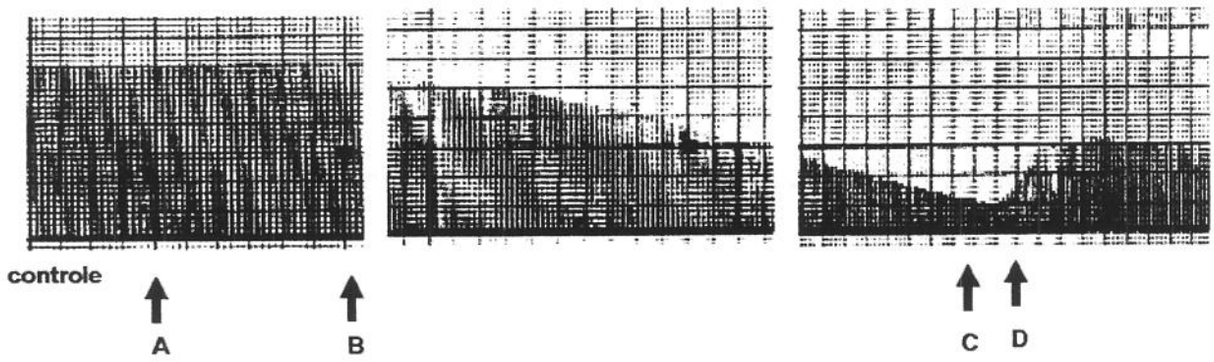


Figura 19- Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico - hemidiafragma de rato (n=5), previamente expostas a lidocaína (20μg/mL). Efeito da neostigmina. **A**: adição de lidocaína; **B**: adição de rocurônio, 30 minutos após a lidocaína; **C**: 60 minutos após adição de rocurônio; **D**: adição de neostigmina (2 μg/mL)

A análise estatística mostrou diferença significante (p= 0,0079) entre o bloqueio neuromuscular produzido pelos bloqueadores neuromusculares (d-tubocurarina e rocurônio) empregados isoladamente e o bloqueio produzido nas preparações previamente expostas aos anestésicos locais (procaína e lidocaína) - **(Tabelas 3, 4, 7 e 8 - Anexo).**

4.1.3- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) na ação contraturante da acetilcolina. Preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado

Na preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado foram estudadas as respostas a acetilcolina (5μg/mL) antes e após a adição dos anestésicos locais: procaína (40μg/mL) e lidocaína (20μg/mL).

Após adição da acetilcolina na preparação contendo procaína observou-se uma diminuição significativa de 52,75% ± 5,66 na amplitude da resposta a acetilcolina **(Tabela 11 - Anexo)**, quando comparada à resposta controle (p=0,0431) **Figura 20 e Gráfico 1.**

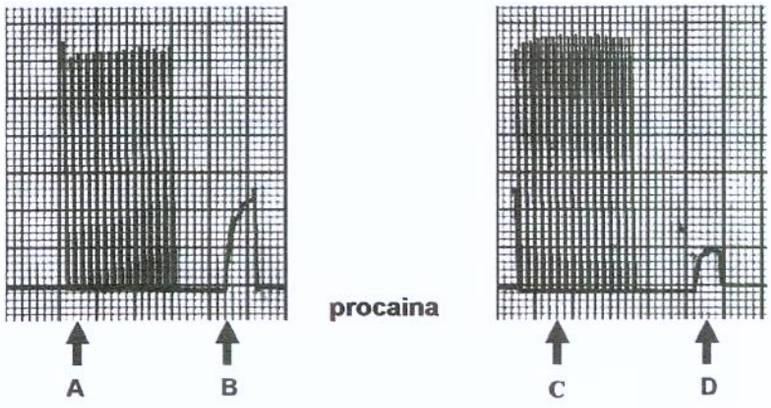


Figura 20- Registro miográfico do efeito da procaína (40 μg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5μg/mL) em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado (n=5), sob estimulação elétrica direta (freqüência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A**: controle; **B**: adição de acetilcolina; **C**: 30 minutos após a adição de procaína, **D**: adição de acetilcolina

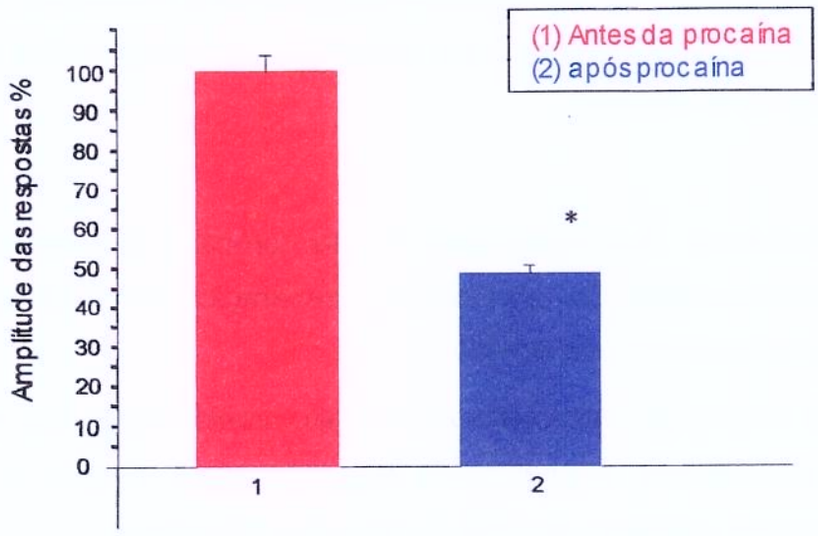


Gráfico 1- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5μg/mL) em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado, antes e 30 minutos após a procaína (40μg/mL)

Na preparação contendo lidocaína (20μg/mL) observou-se diminuição de 19,35% ± 6,83 **(Tabela 12 - Anexo)** na amplitude da resposta a acetilcolina, estatisticamente significativa (p=0,0431) em relação à resposta controle **(Figura 21 e Gráfico 2)**.

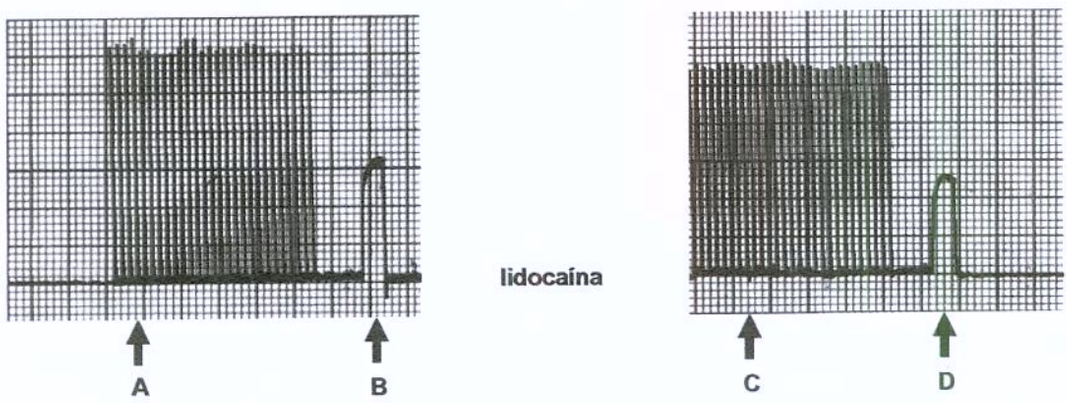


Figura 21- Registro miográfico do efeito da lidocaína (20 μg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5μg/mL) em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado (n=5), sob estimulação elétrica direta (freqüência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A**: controle; **B**: adição de acetilcolina; **C**: 30 minutos após a adição de lidocaína, **D**: adição de acetilcolina

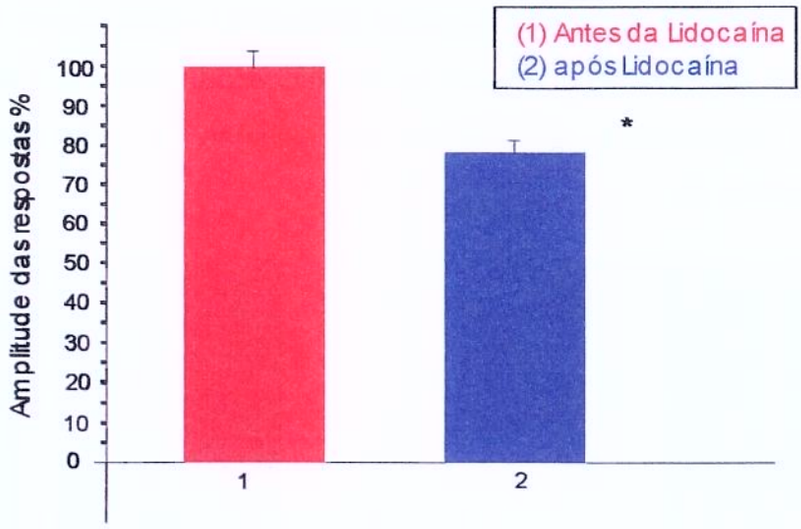


Gráfico 2- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5μg/mL) em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado, antes e 30 minutos após a lidocaína (20μg/mL)

4.1.4- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) na ação contraturante da acetilcolina. Preparação *biventer cervicis* de pintainho

Na preparação *biventer-cervicis* de pintainho, a procaína (40μg/mL) adicionada à preparação 30 minutos antes da acetilcolina (5μg/mL), promoveu diminuição de 50,32% ± 4,51 **(Tabela 13 - Anexo)** na amplitude da resposta a acetilcolina, estatisticamente significante quando comparada com a resposta observada antes da adição da procaína (p= 0,0431) **Figura 22 e Gráfico 3.**

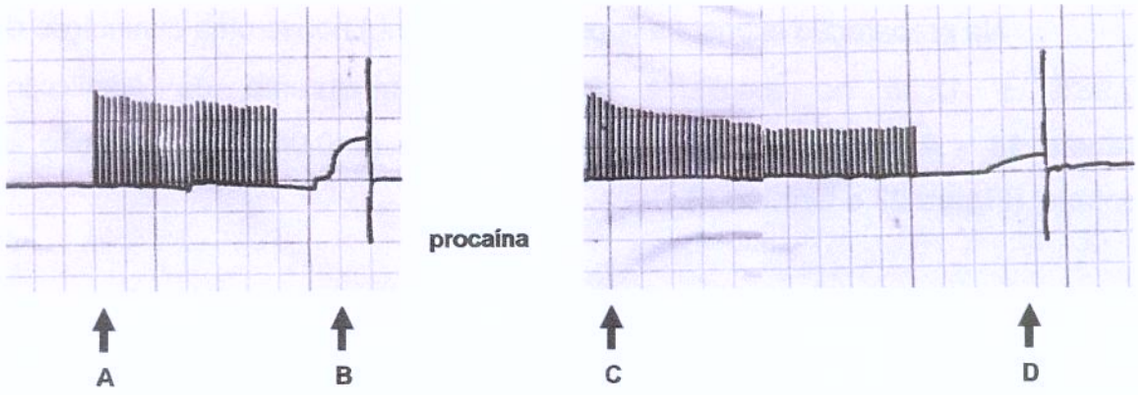


Figura 22- Registro miográfico do efeito da procaína (40 μg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5μg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho (n=5), sob estimulação elétrica indireta (freqüência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A**: controle; **B**: adição de acetilcolina; **C**: 30 minutos após a adição de procaína, **D**: adição de acetilcolina

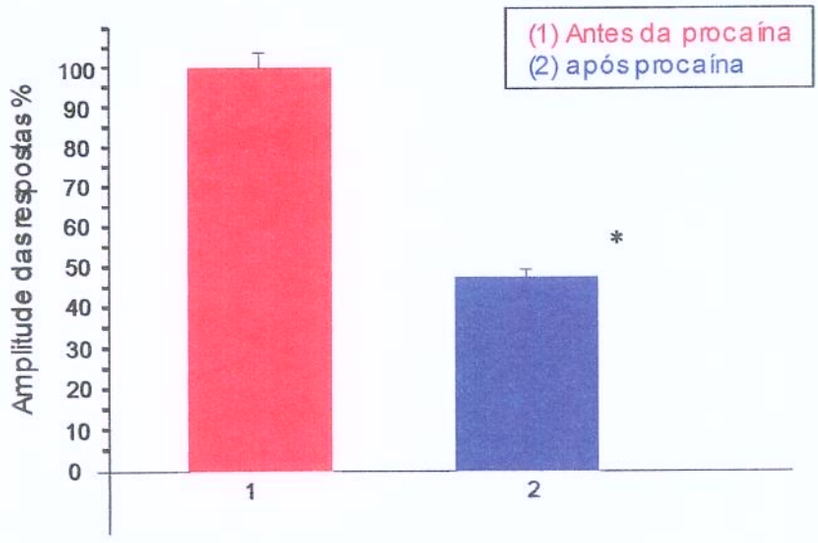


Gráfico 3- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5μg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a procaína (40μg/mL)

Na preparação exposta a lidocaína (20μg/mL) houve uma diminuição de 22,93% ± 12,35 na amplitude da curva contraturante de acetilcolina **(Tabela 14 - Anexo)**, estatisticamente significante (p=0,0431) em relação ao controle **(Figura 23 e Gráfico 4)**

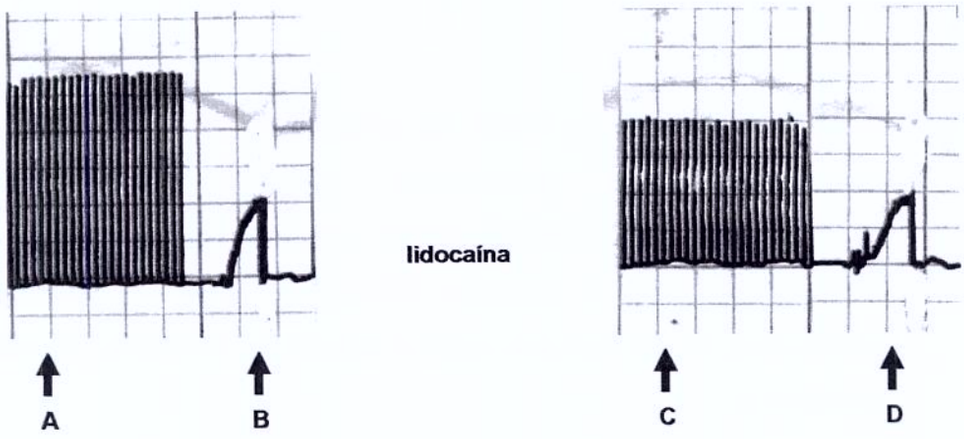


Figura 23- Registro miográfico do efeito da lidocaína (20 μg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5μg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho (n=5), sob estimulação elétrica indireta (freqüência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A**: controle; **B**: adição de acetilcolina; **C**: 30 minutos após a adição de lidocaína; **D**: adição de acetilcolina

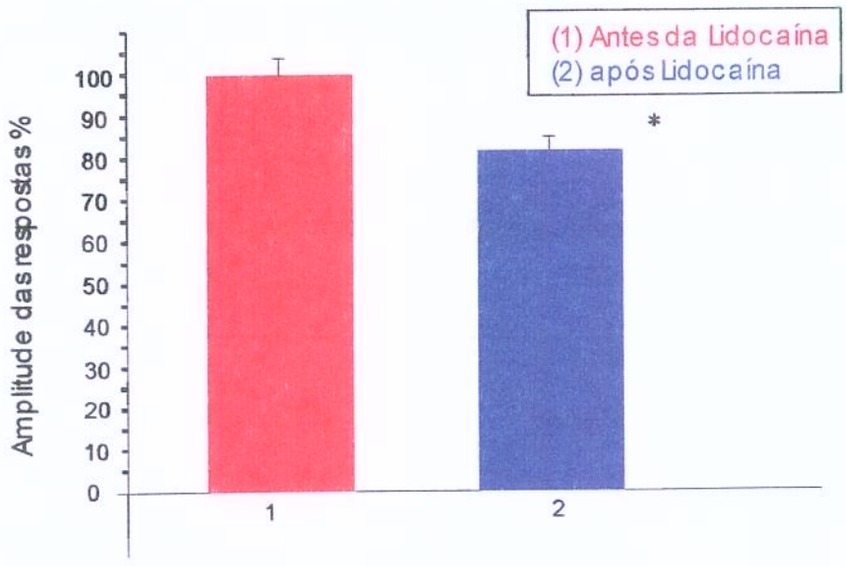


Gráfico 4- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5μg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a lidocaína (20μg/mL)

4.2- Estudos eletrofisiológicos

4.2.1- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) nos Potenciais de Membrana (PM)

Os anestésicos locais nas concentrações empregadas não causaram alterações significativas nas medidas do potencial de membrana, demonstrando que nestas concentrações a procaína e a lidocaína não possuem ação despolarizante sobre a fibra muscular **(Tabelas 1 e 2; Gráficos 5 e 6).**

Tabela 1- Valores médios e desvios padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de hemidiafragma de rato expostas a procaína (40μg/mL)

Tempo (min)	Potencial medido em mV (x ± DP)	Comparação com o controle pelo teste de Wilcoxon pareado
0	82 ± 5,2	Controle
10	82 ± 5,9	Não significativo
20	84 ± 5,2	Não significativo
30	85 ± 6,1	Não significativo
40	84 ± 4,8	Não significativo
50	84 ± 4,2	Não significatvo
60	85 ± 4,5	Não significativo

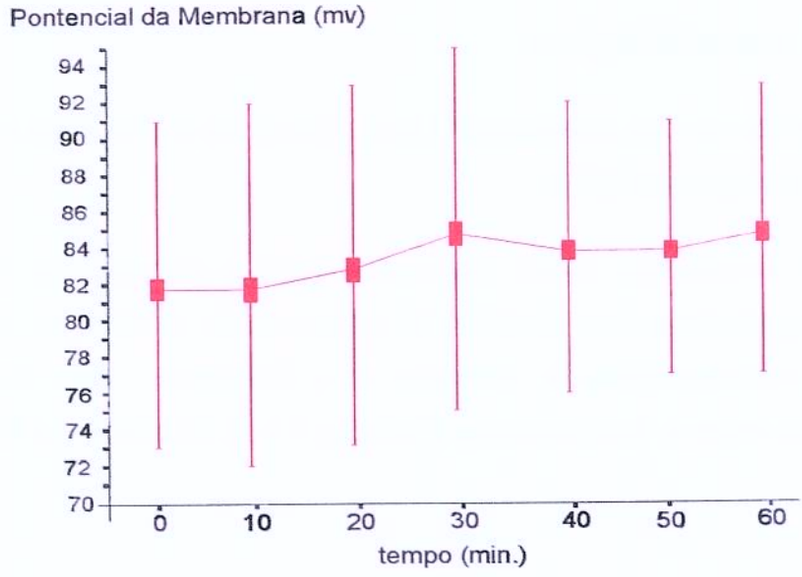


Gráfico 5- Efeito da procaína (40 μg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa à média ± desvio padrão de cinco experimentos.

Tabela 2- Valores médios e desvios padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de hemidiafragma de rato expostas a lidocaína (20μg/mL)

Tempo (min)	Potencial medido em mV (x ±DP)	Comparação com o controle pelo teste Wilcoxon pareado
0	84 ± 2,8	Controle
10	87 ± 3,1	Não significativo
20	85 ± 2,6	Não significativo
30	83 ± 3,4	Não significativo
40	82 ± 2,2	Não significativo
50	86 ± 1,8	Não significativo
60	88 ± 2,0	Não significativo

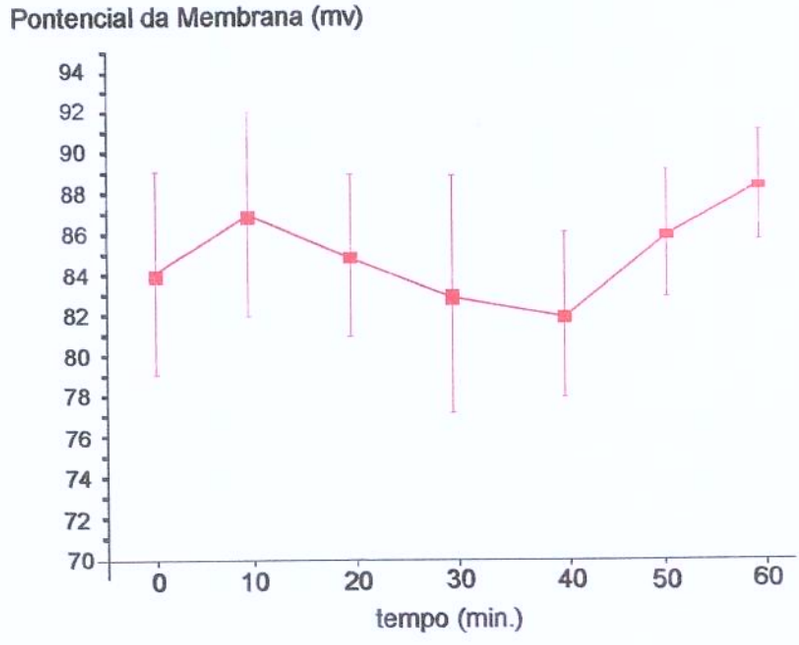


Gráfico 6- Efeito da lidocaína (20 μg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa à média ± desvio padrão de cinco experimentos

4.2.2- Influência dos Anestésicos Locais (procaína e lidocaína) nos Potenciais de Placa Terminal em Miniatura (PPTM)

Na concentração estudada, a procaína causou diminuição progressiva da freqüência e da amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura, até o bloqueio total observado aos 60 minutos da adição da droga **(Figura 24).**

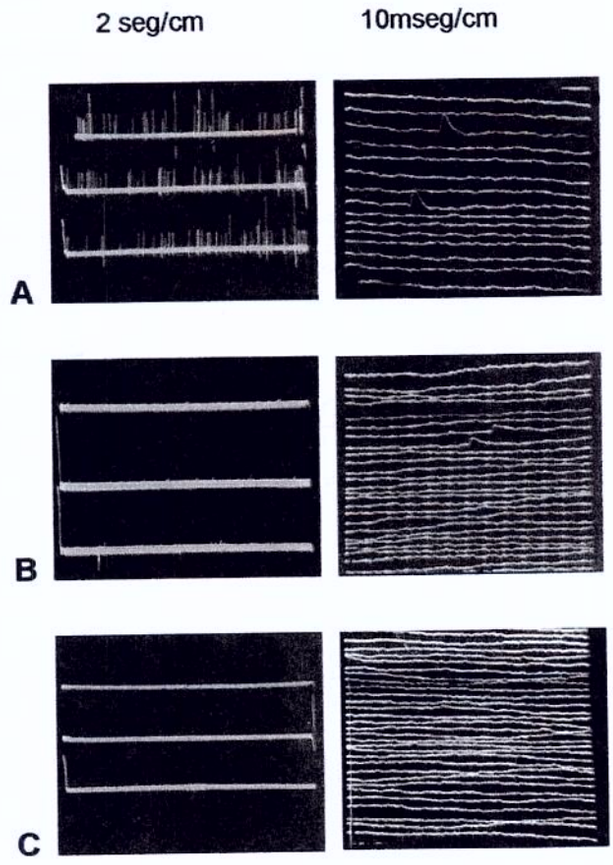


Figura 24- Efeito da procaína (40μg/mL) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação hemidiafragma de rato. **A**: antes da adição de procaína (controle); **B**: 30 minutos após a adição de procaína; **C**: 60 minutos após a adição da procaína

Com a lidocaína (20μg/mL) inicialmente verificou-se um aumento na freqüência, mas não na amplitude dos potenciais em miniatura de placa terminal, seguido de bloqueio após 60 minutos de exposição à droga **(Figura 25)**.

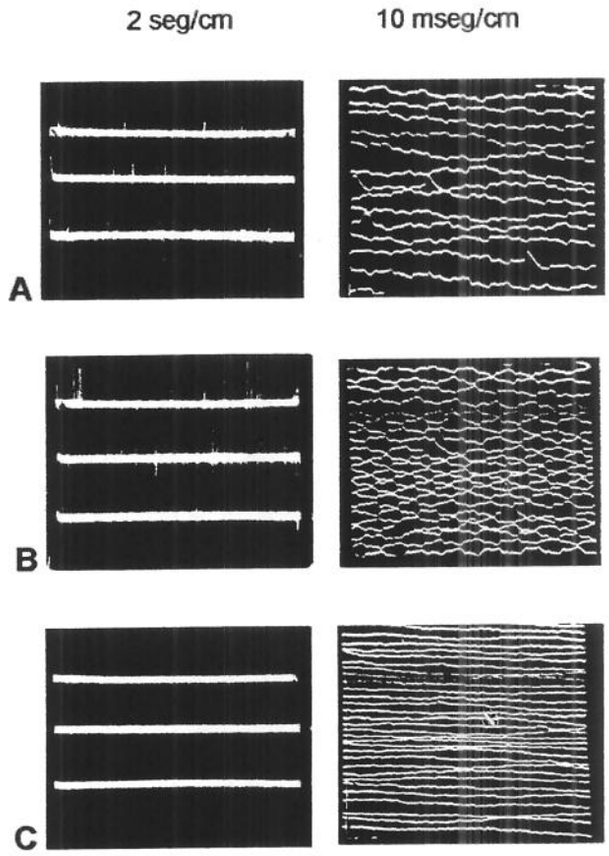


Figura 25- Efeito da lidocaína (20μg/mL) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação hemidiafragma de rato. **A**: antes da adição de lidocaína (controle); **B**: 30 minutos após a adição de lidocaína; **C**: 60 minutos após a adição da lidocaína

5- DISCUSSÃO

Os efeitos de anestésicos locais na junção neuromuscular e sua influência no bloqueio neuromuscular produzido por bloqueadores neuromusculares competitivos é ainda alvo de pouca investigação.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que em preparação nervo frênico-diafragma de rato, a procaína e a lidocaína nas concentrações empregadas e administradas isoladamente não comprometem a transmissão neuromuscular. Resultados semelhantes foram também observados com a d-tubocurarina empregada isoladamente, no entanto, quando adicionada em preparação previamente exposta aos anestésicos locais, proporcionou evidente bloqueio neuromuscular. Ao contrário do observado com a d-tubocurarina, o rocurônio, em preparação livre de anestésico local, produziu redução na amplitude das respostas musculares, bloqueio que foi significativamente potencializado nas preparações expostas previamente aos anestésicos locais.

Estes resultados se assemelham a de outros autores que também relataram ausência de efeito dos anestésicos locais na transmissão neuromuscular, mas observaram potencialização de diferentes bloqueadores neuromusculares, quando do emprego de anestésicos locais por diferentes vias de administração (ELLIS et al, 1953; HARRAH et al, 1970; MATSUO et al, 1978; TOFT et al, 1990; TAIVAINEN et al, 1994; CARDOSO et al, 2005).

CORBETT e LORENZO (1973) relataram os resultados de alguns autores que não evidenciaram ação direta dos anestésicos locais sobre a placa mioneural, mas admitiam uma possível interação dessas drogas com os bloqueadores neuromusculares adespolarizantes, potencializando o efeito destes na junção neuromuscular. Resultados semelhantes já haviam sido relatados por FONTANA e VITAL BRAZIL (1973), que observaram potencialização do bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina, em preparação previamente exposta a procainamida. Estes achados foram confirmados recentemente por MARTINS e FONTANA (2004), e concluíram ser esta potencialização atribuída a um decréscimo do número de receptores pós-sinápticos disponíveis (do tipo *down regulation*), ocasionado pela exposição prolongada da junção neuromuscular a

procainamida, e não a um efeito competitivo direto entre a procainamida e o neurotransmissor.

Pode-se, portanto inferir que os anestésicos locais diminuem a margem de segurança da junção neuromuscular facilitando a ligação dos bloqueadores neuromusculares no seu local de ação. Este fato pode explicar o bloqueio neuromuscular causado por baixas concentrações de d-tubocurarina quando associada aos anestésicos locais, efeito não evidenciado quando do emprego isolado da d-tubocurarina em baixas concentrações.

MATSUO et al (1978) estudando em preparação nervo frênico-diafragma de rato, a ação da associação da d-tubocurarina a diferentes anestésicos locais, procaína, lidocaína e etidocaína, observaram que mesmo em concentrações consideradas ineficazes, os anestésicos locais diminuíram significantemente a ED_{50} dos agentes bloqueadores neuromusculares, e que estes em concentrações efetivas para causar bloqueio neuromuscular também causaram similar diminuição da ED_{50} dos anestésicos locais. Assim os autores concluíram que a interação bloqueadores neuromusculares - anestésicos locais, pode dever-se a potencialização verdadeira, causada pela ação dos dois tipos de drogas, em diferentes sítios da junção neuromuscular.

A interação entre bloqueadores neuromusculares e anestésicos locais pode ser devida a diferentes mecanismos: ação pré-sinaptica, como diminuição de liberação acetilcolina, e ação pós-sináptica, como estabilização da membrana pós-juncional, não sendo excluída a interferência com o mecanismo de excitação-contração da fibra muscular (STRAUGHAN, 1961; USUBIAGA e STANDAERT, 1968; MATSUO et al, 1978; NEHER e STEINBACH, 1978; SINE e TAYLOR, 1982; TARDELLI, 2001).

Na associação medicamentosa perioperatória, a ação de uma droga é modificada por outras com finalidade clínica bem estabelecida: sinergismo por adição, potencialização ou antagonismo. No entanto a interação medicamentosa é ambivalente, podendo trazer benefícios terapêuticos ou efeitos tóxicos, devendo o controle farmacológico ser mantido para a segurança do ato anestésico.

A potencialização dos bloqueadores neuromusculares pelos anestésicos locais, pode ocasionar efeitos indesejáveis durante e após a realização de procedimentos cirúrgicos, quando do uso simultâneo destas drogas (MATSUO et al, 1978; PEDERNEIRAS, 1988).

MATSUO et al (1978) descreveram que esta potencialização, pode ser evidenciada por um aumento na duração do bloqueio neuromuscular com apnéia, necessitando de assistência ventilatória. Em seus experimentos, a associação d-tubocurarina (0,34 ± 0,01μg/ml) e lidocaína (25 μg.ml) produziu 90% de bloqueio neuromuscular. Neste trabalho, o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina e pelo rocurônio, em preparação nervo frênico-diafragma de rato, também foi significativamente aumentado pelos anestésicos locais.

Na década de 50, ELLIS et al (1953), em experimentos realizados em gatos, observaram que a procaína embora não exerça efeito na transmissão neuromuscular, intensifica o bloqueio produzido pela d-tubocurarina e succinilcolina, resultados confirmados em outros trabalhos que também relataram ser verdadeira esta interação para outros anestésicos locais e bloqueadores neuromusculares (HARRAH et al, 1970; MATSUO et al, 1978).

Alguns autores, estudaram em preparação NFD os efeitos da lidocaína e d-tubocurarina e observaram bloqueio neuromuscular aumentado, que foi atribuído ao fato da lidocaína bloquear a condução nas terminações nervosas motoras, com prejuízo na liberação de acetilcolina (efeito pré-sináptico), além de inibir a despolarização da membrana pós-juncional devido ao bloqueio dos canais de sódio e potássio (BRUCKNER et al, 1980).

Várias drogas usadas para o tratamento de disritmias também aumentam os efeitos dos bloqueadores neuromusculares, particularmente os da d-tubocurarina. Por esta razão a administração de lidocaína endovenosa para o tratamento de arritmias cardíacas em pacientes cirúrgicos, que necessitam de anestesia geral e bloqueadores neuromusculares, deve ser cuidadosa e a monitorização do bloqueio neuromuscular criteriosa (HARRAH et al, 1970).

Em experimentos realizados em gatos, o bloqueio neuromuscular produzido pela associação lidocaína-pancurônio, foi 20% maior e estatisticamente significante, em relação ao observado quando do emprego do pancurônio isoladamente (CARPENTER e MULROY, 1986). Similarmente, a lidocaína na dose de $5mg.kg^{-1}$ administrada por via venosa, também aumentou em 25% o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina (HARRAH et al, 1970). Outros estudos demonstraram que os anestésicos locais administrados como agentes antiarrítmicos durante ou no pós-operatório podem aumentar o bloqueio residual (TELIVUO e KATZ, 1970; PEDERNEIRAS, 1988).

BOWMAN et al (1970) descreveu que existe uma teoria relacionada com o modo de ação dos anestésicos locais, que se baseia na hipótese de que a acetilcolina está envolvida na condução nervosa, e as moléculas de muitos anestésicos locais por apresentarem semelhança estrutural com a acetilcolina, são capazes de antagonizar sua ação em vários tecidos. Esse conjunto sugere que os anestésicos locais bloqueiam a condução, antagonizando a ação da acetilcolina dentro da membrana.

O bloqueio neuromuscular ocasionado pela associação anestésicos locais – bloqueadores neuromusculares, foi revertido pela neostigmina e pela 4-aminopiridina (4AP). A eficácia da neostigmina na reversão do bloqueio foi menor quando comparada à observada com a 4AP, onde a amplitude das contrações musculares ocasionadas pela estimulação do nervo frênico ultrapassou a amplitude das respostas consideradas controle.

Estes resultados também foram relatados por MATSUO et al (1978) que obtiveram amplitudes das respostas musculares maiores do que as observadas no momento controle, quando do emprego da 4AP para a reversão do bloqueio neuromuscular, causado pela associação de procaína ou de lidocaína a d-tubocurarina. No entanto, este efeito foi somente parcial, quando a 4AP foi utilizada para reversão do bloqueio neuromuscular produzido pela associação procaína e succinilcolina e não apresentou efeito sobre o bloqueio ocasionado pela lidocaína associada à succinilcolina.

A neostigmina, ao inibir a acetilcolinesterase, aumenta a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica, capaz de deslocar competitivamente os agentes causadores do bloqueio, presentes nos receptores nicotínicos, com conseqüente recuperação da transmissão neuromuscular.

As aminopiridinas possuem mecanismos de ação distintos na junção neuromuscular, ou seja, se a preparação está submetida a estímulos, a reversão do bloqueio deve-se ao aumento indireto na concentração do neurotransmissor na fenda sináptica, porém se esta se encontra em repouso, as aminopiridinas agem revertendo a dessensibilização dos receptores (VITAL BRAZIL et al,1979; PAVANI, 1983).

A 4-aminopiridina, além do efeito inibidor de dessensibilização de receptores nicotínicos da placa terminal, provoca grande aumento dos quanta de acetilcolina, sendo esse aumento resultante de duas ações distintas na membrana das terminações nervosas: inibição dos canais de potássio, o que produz aumento na duração do potencial de ação, e maior influxo de íons cálcio para as terminações nervosas motoras durante a despolarização da membrana (ULBRICHT e WAGNER, 1976; YEH et al, 1976; HARVEY e MARSHALL, 1977a; HARVEY e MARSHALL, 1977b; VITAL BRAZIL et al, 1979; VITAL BRAZIL et al, 1989). Embora o mecanismo subsináptico pelo qual a 4-aminopiridina aumenta a liberação do transmissor ainda não esteja completamente elucidado, a eficácia da droga como antagonista do bloqueio neuromuscular pré e pós-sináptico tem sido evidenciado em testes experimentais (ULBRICHT e WAGNER, 1976; YEH et al, 1976; BOWMAN et al, 1977; HARVEY e MARSHALL, 1977a; HARVEY e MARSHALL, 1977b; VITAL BRAZIL et al, 1979; VITAL BRAZIL et al, 1989). No entanto seu uso na clínica não é preconizado, pois atravessa facilmente a barreira hematoencefálica com estimulação do SNC, podendo causar convulsões (HARVEY e MARSHALL, 1977b).

O fato de ambas as drogas reverterem parcial ou totalmente o bloqueio neuromuscular produzido pela associação anestésicos locais - bloqueadores neuromusculares, pode indicar como causa, um bloqueio dos receptores nicotínicos da placa terminal.

Recentemente, MARTINS e FONTANA (2004) descreveram que o bloqueio dos PPTMs causado pela procainamida, pode ser revertido pela neostigmina, o que pode indicar que o anestésico local esteja ocupando o receptor pós-sináptico, e este é deslocado pela maior concentração de acetilcolina presente na fenda sináptica. Os PPTMs também reapareceram após a 4AP, e isto se deve provavelmente ao bloqueio dos canais de potássio, e aumento na liberação de neurotransmissor (VITAL BRAZIL e FONTANA, 1982; PAVANI, 1983; MARTINS e FONTANA,2004).

Para se estudar a ação dos anestésicos locais nos sítios pré e pós-sinápticos foram realizados estudos eletrofisiológicos. Esses experimentos detectam a liberação espontânea de um quantum de acetilcolina podendo se investigar a influência pré e pós-sináptica das drogas utilizadas, pela sua interferência nos processos de produção ou liberação do mediador.

Os anestésicos locais devido ao bloqueio da condução dentro da fibra nervosa, podem interferir com a transmissão neuromuscular, não existindo evidências que eles inibam a síntese de acetilcolina, mas em baixas concentrações reduzem a amplitude, sem alteração na freqüência do potencial de placa terminal em miniatura. Assim, a influência do anestésico local sobre esses parâmetros indica que eles diminuem a liberação da acetilcolina ou diminuem a sensibilidade da membrana pós-juncional para a acetilcolina (STRAUGHAN, 1961; MATTHEWS e QUILLIAM, 1964; USUBIAGA e STANDAERT, 1968). O efeito pós-juncional pode ser atribuído à interferência com o receptor ocupado pelo transmissor ou com a mudança no potencial de equilíbrio do transmissor (MAENO et al, 1971; NEHER e STEINBACH, 1978; RUFF, 1982).

A pequena quantidade de acetilcolina, inefetiva para deflagrar um potencial de ação, é continua e espontaneamente liberada sem a necessidade de haver um estímulo elétrico neuronal. Essa liberação é responsável por pequenos potenciais de amplitude correspondente a centésima parte do potencial de placa terminal, denominados de minipotencial de placa ou potenciais em miniatura da placa terminal, cuja função é desconhecida, mas parece estar relacionada à manutenção do trofismo muscular (FATT e KATZ, 1952).

Embora a procaína e a lidocaína empregadas isoladamente não tenha comprometido a transmissão neuromuscular, efeito evidenciado nas respostas musculares a estimulação indireta, os resultados dos estudos eletrofisiológicos mostram que estas drogas nas concentrações empregadas, interferem nos potenciais em miniatura da placa terminal. Observou-se que a procaína causou bloqueio progressivo destes, com diminuição na freqüência e na amplitude, até o seu completo desaparecimento. As alterações do potencial de placa terminal em miniatura exteriorizam uma ação pré-sináptica, com modificações na liberação quantal da acetilcolina.

Ao contrario, a lidocaína inicialmente aumenta a freqüência dos potenciais, mas com redução na amplitude. Isto pode ser atribuído a uma possível ação pré-sináptica, com aumento na liberação do neurotransmissor e a ação pós-sináptica. O efeito inicial da lidocaína sobre os PPTMs, a semelhança do observado por MARTINS e FONTANA (2004), quando do emprego da procainamida, pode também dever-se a um mecanismo inibidor da acetilcolinesterase com aumento da acetilcolina na fenda sináptica ou a certa atividade agonista intrínseca e, por isso, pode ativar os receptores nos estágios iniciais de sua ação.

Uma outra explicação para a interação lidocaína - bloqueadores neuromusculares, é o fenômeno de dessensibilização do receptor provocado pela interação prolongada dos receptores com a acetilcolina e análogos, e consequentemente tornando a placa terminal refratária a acetilcolina, sem, no entanto ocorrer despolarização persistente dessa região (THESLEFF, 1955a;

THESLEFF, 1955b; VITAL BRAZIL e FONTANA, 1982; PAVANI, 1983). Esse fenômeno de dessensibilização da placa terminal pela lidocaína poderia ser explicado pelo aumento inicial na concentração de acetilcolina, devido ou a ação pré-sináptica ou a uma provável inibição da acetilcolinesterase. Na membrana pós-sináptica, os anestésicos locais são capazes de se ligar às áreas específicas dos receptores nicotínicos, diferentes das de acetilcolina promovendo a dessensibilização destes receptores (SINE e TAYLOR, 1982; MARTINS e FONTANA, 2004).

A possível ação pré-sináptica da lidocaína também pode explicar o discreto aumento na amplitude das respostas musculares a estimulação indireta, observado imediatamente após adição da droga na preparação nervo frênico diafragma de rato.

Observou-se que nas concentrações empregadas os anestésicos locais não causaram alterações nos potenciais de membranas das fibras musculares, confirmando achados de BOWMAN (1980) de que estas drogas não possuem ação despolarizante sobre a fibra muscular, que atuam predominantemente na placa motora terminal, não estando à ação na junção neuromuscular relacionada com sua atividade estabilizadora da membrana muscular. Substâncias desse tipo impedem a condução dos potenciais de ação propagados sem afetar o potencial de membrana.

As duas drogas, procaína e lidocaína utilizadas neste experimento interagiram com os bloqueadores neuromusculares, por ações diferenciadas. Isso também foi evidenciado nos experimentos em que se estudou os efeitos destas drogas na resposta a acetilcolina. Neste estudo a procaína e a lidocaína diminuíram significativamente a resposta contraturante induzida pela acetilcolina, nas preparações diafragma de rato cronicamente desnervado e biventer cervicis de pintainho. Estes resultados sugerem uma ação pós-sináptica dos anestésicos locais sobre os receptores nicotínicos, portanto uma ação curaremimética, e não efeito sobre as fibras musculares. Este fato também é demonstrado pela presença

de respostas musculares quando se emprega estímulos elétricos diretos na preparação diafragma cronicamente desnervado.

Nas mesmas preparações, a influência da lidocaína (20μg.mL) na curva de acetilcolina, foi menor do que a observada com a procaína, o que pode ser atribuído a uma menor interação lidocaína-receptor da acetilcolina; ao efeito pré-sináptico evidenciado pelo aumento inicial da freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura e pelo discreto aumento na amplitude das respostas musculares à estimulação indireta, logo após a adição da droga a preparação nervo frênico-diafragma de rato.

Nos experimentos com a preparação biventer cervicis de pintainho não foram observadas contraturas musculares em resposta a procaína e a lidocaína resultados contrários aos de WALI (1984) que relatou contratura na musculatura da ave ocasionado pela lidocaína, além de potencialização do efeito despolarizante do tetraetilamônio. Esses efeitos podem dever-se a um aumento na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (WALI, 1984; COLLINS, 1993)

Drogas que atuam pós-sinapticamente podem bloquear a ação nos receptores e as respostas à estimulação indireta, mas não afetam a resposta a estimulação direta do músculo. Portanto acredita-se que a procaína e a lidocaína possam agir predominantemente em receptores colinérgicos pós-sinápticos, impedindo ou diminuindo a ação do neurotransmissor.

Os resultados mostram que os anestésicos locais (procaína e lidocaína) na concentrações estudadas e empregados isoladamente não comprometeram a transmissão neuromuscular, mas potencializaram o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina e pelo rocurônio. As alterações do potencial de placa terminal em miniatura exteriorizam uma ação pré-sináptica, modificando a liberação quantal de acetilcolina e a ausência de alterações no potencial de membrana demonstra que nesta concentração estas drogas não possuem ação despolarizante sobre a fibra muscular e que o provável local de ação é na junção neuromuscular, particularmente na placa motora terminal. O antagonismo

completo obtido com a 4-aminopiridina sugere que a interação dos anestésicos locais com os bloqueadores neuromusculares tem um componente pré-sináptico, relacionado à diminuição da liberação de acetilcolina. O antagonismo parcial pela neostigmina suporta esta idéia, uma vez que os anticolinesterásicos são eficazes apenas na reversão do bloqueio pós-sináptico.

É provável que a potência dos anestésicos locais na junção neuromuscular possa diferir entre as diferentes espécies, e embora a extrapolação desses resultados para humanos não seja quantitativamente semelhante, as implicações clinicas dessa interação tornam evidentes a necessidade de monitorização do bloqueio neuromuscular, e de se reduzir à dose de bloqueadores neuromusculares quando do uso simultâneo dessas drogas.

6- CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados neste trabalho sobre os efeitos dos anestésicos locais, procaína e lidocaína, na junção neuromuscular e a sua influência nos efeitos dos bloqueadores neuromusculares, d-tubocurarina e rocurônio, pôde-se concluir que os anestésicos locais nas concentrações estudadas:

1. não comprometeram a transmissão neuromuscular, mas potencializaram o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina e pelo rocurônio;

2. não alteraram o potencial de membrana, demonstrando que o local de ação é na junção neuromuscular e não na fibra muscular;

3. apresentaram efeito pré-sináptico refletido por alterações nos potenciais de placa terminal em miniatura;

4. apresentaram efeito pós-sináptico, refletido por diminuição na resposta a acetilcolina;

5. a neostigmina e a 4-aminopiridina foram eficazes na reversão do bloqueio neuromuscular produzido pela associação anestésicos locais - bloqueadores neuromusculares;

As conclusões podem sugerir uma interação do tipo sinergismo entre as drogas estudadas, e deve ser levada em consideração quando do uso simultâneo destas drogas na prática clínica.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES TCA, GUANAIS O. Anestésicos locais.In:SILVA ,P. ***Farmacologia***. 6ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan,2002, p.474-491.

ADLER M, ALBUQUERQUE E X, LEBEDA F J.Kinetic analysis of end-plate currents altered by atropine and scopolamine . ***Mol Pharmac,*** 1978; 14:514-529.

ARANÓ JM, MARIN S; MIRANDA EG. Interacciones. In GÓMEZ JAA, MIRANDA FG, BOZZO RB. ***Relajantes Musculares Em Anestesia Y Terapia Intensiva***. Madrid: Aran, 2000, p 165-186.

ADAMS PR. Voltage-clamp analysis of procaine action at frog end-plate. ***J Physiol,*** 1977; 268:291-318.

BELMONT MR, MAEHR RB, WASTILA WB, SAVARESE JJ. Farmacodinâmica e farmacocinética. Bloqueadores Neuromusculares Benzilisoquinolínicos (curariformes) In: PARTRIDGE BL. ***Clínicas de Anestesiologia da América do Norte-Progressos no Uso de Relaxantes Musculares***. Rio de Janeiro: Interlivros,1993.p.245-274.

BIANCONI ML. Mechanism of action of local anaesthetics: a pratical approach to introducing the principles of pka to medical students. ***Biochemical Education***, 1998;26:11-13.

BOWMAN WC, RAND MJ, WEST GB. Anestesicos locales. In: BOWMAN WC. ***Farmacologia***. Barcelona:Editorial JLMS,1970.p.625-632.

BOWMAN WC, HARVEY AL, MARSHALL IG. The actions of aminopyridines on avian muscle. ***Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol***, 1977;297: 99-103.

BOWMAN WC. Prejunctional and postjunctional cholinoceptors at the neuromuscular junction. ***Anesth Analg***, 1980; 59:935-943.

BRAZ JRC, VANE LA, TAMBURINI Jr R, VIANNA PTG. Influência do pH no grau de dissociação iônica dos anestésicos locais. ***Rev. Bras. Anestesiol***, 1983;33: 275-277.

BRUCKNER J, THOMAS KC Jr, BIKHAZI GB, FOLDES FF. Neuromuscular drug interactions of clinical importance. ***Anesth Analg***, 1980;59:678-682.

BULBRING E. Observation on the isolated phyrenic 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 Anestesiol***, 2005; 55:371-380.

CARMICHAEL, F.J. Anestésicos locais. In: KALANT, H. ***Princípios de Farmacologia Médica***. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.192-197.

CARPENTER RL, MULROY MF. Edrophonium antagonize combined lidocaíne-pacuronium and verapamil-pancuronium neuromuscular blockade in cats. ***Anesthesiology***, 1986; 65:506-510.

CATTERALL W, MACKIE K. Local Anesthetics. In: HARDMAN JG et al. ***The pharmacological basis of therapeutica***. New York: MacGraw-Hill, 9ed, 1996. p 331-347.

COLLINS VJ. Intravascular local anesthetics and regional block. In: COLLINS VJ. ***Principles of Anesthesiology - general and regional anesthesia***. Philadelphia: Lea & Febiger, 3rd ed, 1993. p 787-808.

COOPER R,MIRAKHUR RK, CLARKE RSJ. Comparison of intubating conditions after administration of rocuronium and suxamethonium. ***Br J Anaesth***, 1992; 69:269-273.

CORBETT CE, LORENZO AV. Anestésicos locais e Anestesias Parciais. In:CORBETT CE. ***Farmacodinâmica***. São Paulo: Artes Médicas,1973.p.155-167.

COVINO BG. Farmacologia clínica comparativa dos anestésicos locais. ***Rev Bras Anestesiol***, 1973;23: 204-221.

DONATI F. Onset of action of relaxants. ***Can J Anaesth***, 1988; 35:S52-58.

DUARTE DF. Curarizantes. Das suas origens aos dias de hoje. ***Rev Bras Anestesiol***, 2000; 50:330-336

DUVAL NETO GF. pH tecidual durante bloqueio regional: influência da adição de adrenalina às soluções de anestésicos locais. ***Rev Bras Anestesiol***, 1984; 34: 295-299.

ELLIS CH, WNUCK AL, DE BEER EJ, FOLDES FF. Modifying actions of procaine on the myoneural blocking actions of succinylcholine, decamethonium and d-tubocurarine in dogs and cats. ***Am J Physiol***, 1953; 174: 277-282.

FATT P, KATZ B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. ***J Physiol***, 1951; 115: 320-370.

FATT P, KATZ B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. ***J Physiol***, 1952; 117: 109.

FONTANA MD, VITAL BRAZIL O. Sobre o mecanismo da potenciação causada pela quinidina e procainamida sobre o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina. ***Ciência e Cultura***, 1973; 25: 482.

FURTADO RD, BEDIN A, SIMONI V, CASTRO RAC. Rocurônio: Farmacologia e Uso Clínico. ***Rev Bras Anestesiol***,1997; 47:168-176.

FURUKAWA T. Properties of procaine end-plate potential. ***Jap J Physiol***, 1957; 7:199-212.

GAGE PW, HAMILL OP, WACHTEL RE. Sites of action of procaine at the motor end-plate. ***J Physiol***, 1983; 335:123-127.

GELSER RM, MATSUBA M. Neuromuscular blocking actions of local anesthetics. ***J Pharmacol Exp Ther***, 1951; 103:314.

GINSBORG BL, WARRINER J. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. ***Br J Pharmacol Chemother***, 1960;15: 410-411.

GORNIAK SL. Anestésicos Locais. In: SPINOSA, S. ***Farmacologia Veterinária***. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1999. p.98-128.

HARRAH MD, WAY WL, KATZUNG BG. The interaction of d-tubocurarine with antiarrhythmic drugs. ***Anesthesiology***, 1970; 33:406-410.

HARVEY AM. The action of procaine on neuromuscular transmission. ***Bull Johns Hopkins Hosp***, 1939; 65:223.

HARVEY AL, MARSHALL IG. The facilitatory actions of aminopyridines and tetraethylammonium on neuromuscular transmission and muscle contractility in avian muscle. ***Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol***, 1977a;299:53-60.

HARVEY AL, MARSHALL IG. The actions of three diaminopyridines on the chick biventer cervicis muscle. ***Eur J Pharmacol***, 1977b; 44:303-309.

HIRST GDS , WOOD DR. On the neuromuscular paralysis produced by procaine. ***Br J Pharmac***, 1971; 41:94-104.

HUNTER JM. New neuromuscular blocking drugs. ***N Engl J Med***, 1995; 332:1691-1699.

KATZ B, MILEDI R. A re-examination of curare action at the motor end-plate. ***Proc R Soc***, 1978; 203:119-133.

KORDAS M. The effect of procaine on neuromuscular transmission. ***J Physiol***, 1970; 209:689-699.

KRNJEVIC K, MILEDI R. Failure of neuromuscular propagation in rats. ***J Physiol***, 1958; 140:440-461.

LIEN CA, BELMONT MR, KOPMAN AF. New and currently avaiable muscle relaxants. ***Refresher Courses in Anesthesiology/ASA***,1994;21:255-282.

MAENO T. Analysis of sodium and potassium conductances in the procaine end-plate potencial. ***J Physiol***,1966;183:592-606.

MAENO T, EDWARDS C, HASHIMURA S. Difference in effects and end-plate potencials between procaine and lidocaine as revealed by voltage clamp experiments. ***J Neurophysiol***, 1971; 34:32-34.

MARTINS RS; MARTINS ALC. Bloqueadores neuromusculares. In: MANICA J. ***Anestesiologia. Princípios e Técnicas***. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, p 308-331.

MARTINS TD, FONTANA MD. Estudo do Mecanismo de Ação da Procainamida sobre a Junção Neuromuscular. ***Dissertação de Mestrado***. Faculdade de Ciências Médicas , Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 2004; 83p.

MATSUO S, RAO DB, CHAUDRY I, FOLDES FF. Interaction of muscle relaxants and local anesthetics at the neuromuscular junction. ***Anesth Analg***, 1978;57:580-587.

MATTHEWS EK, QUILLIAM JP. Effects of central depressant drugs upon acetylcholine release. ***Br J Pharmacol Chemother***, 1964;22:415-440.

MILLER RD. Neuromuscular blocking agents. In: SMITH N, MILLER RD, CORBASCIO AN. ***Drug interations in anesthesia***. Philadelphia,1981:249-269.

MILNE RJ, BYRNE JH. Effects of hexamethonium and decamethonium on end-plate current parameters. ***Molec Pharmac***,1981;19:276-281.

MORGAN GEJ, MIKHAIL MS, Anestésicos locais. In: MORGAN GEJ, MIKHAIL MS. ***Anestesiologia Clínica***. 2ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. p.184-190.

MUNAKATA K, SUZUKI T, WATANABE N, NAGAI H, KAKISHITA M, SAEKI S et al. Influence of epidural lidocaine injection on vecuronium-induced neuromuscular blockade. ***Masui***, 2004;53:1377-1380.

NEHER E, STEINBACH JH. Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. ***J Physiol***, 1978; 277: 153-176.

NONAKA A, SUGAWARA T, SUZUKI S, MASAMUNE T, KUMAZAWA T. Pretreatment with lidocaine accelerates onset of vecuronium-induced neuromuscular blockade. ***Masui***, 2002;51:880-883.

PAVANI NJP. Efeito da 3,4 aminopiridina na dessensibilização do receptor da placa terminal provocada por vários agonistas. Natureza do antagonismo entre as aminopiridinas e íon cálcio no fenômeno da dessensibilização. ***Tese de Doutoramento.*** Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 103p; 1983.

PEDERNEIRAS SG. Interação de Drogas com relaxantes musculares. ***Rev Bras Anestesiol***, 1988; 38:63-73.

RUBIN, AP. Anestesia e analgesia locais. In: ADAMS AP; CASHMAN JN. ***Anestesia, analgesia e tratamento intensivo***. Rio de Janeiro:Revinter,1994.p.179-189.

RUFF RL. The kinetics of local anesthetic blockade of end-plate channels. ***Biophys J***, 1982;37:625-631.

SEPULVEDA JD. Historia de los relajantes musculares de síntese. In: GOMEZ JAA, MIRANDA FG, BOZZO RB. ***Relajantes Musculares en anestesia y terapia intensiva***, 2ed; 2000; Madrid: Aran. p.51-60.

SINE MS, TAYLOR P. Local anesthetics and histrionicotoxin are allosteric inhibitors of the acetylcholine receptor. ***J Biol Chem***, 1982; 257: 8106-8114.

SPARR HJ, BEAUFORT TM, FUCHS-BUDER T. Newer Neuromuscular blocking agents: how do they compare with established agents ? ***Drugs***, 2001;61:919-942.

STEINBACH AB. Alteration by xylocaine (lidocaine) and its derivatives of the time course of the end-plate potencial. ***J Gen Physiol***, 1968a; 52:144-161.

STEINBACH AB. A Kinetic model for the action of lxylocaine on receptors for acetylcholine. ***J Gen Physiol***, 1968b; 52:162-180.

STOELTING RK, HILLIER SC. Neuromuscular blocking drugs. In: STOELTING RK, HILLIER SC. ***Pharmacology & Phisiology in Anesthetic Practice***. Philadelphia: Lippincott Williams Wilk, 2006. p 208-250.

STRAUGHAN F. The action of procaine at the neuromuscular junction. ***J Pharm Pharmacol***, 1961;13:49-52.

STRICHARTZ GR, COVINO BG. Anestésicos Locais. In: MILLER RD. ***Anestesia***. 3ed. vol.1. São Paulo:Artes Médicas,1993. p.424-434.

TAIVAINEN T, MERETOJA OA, ROSENBERG PH. The effect of epidural bupivacaine on vecuronium-induced neuromuscular blockade in children. ***Acta Anaesthesiol Scand***, 1994; 38: 453-456.

TARDELLI MA. Função Neuromuscular: Bloqueio, Antagonismo e Monitorização. In: YAMASHITA AM et al. ***Anestesiologia – SAESP***. São Paulo: Atheneu, 5ed, 2001. p 217-244.

TAYLOR P. Agents acting at the neuromuscular junction and autonomic ganglia.In: HARDMAN JG et al. ***The Pharmacological Basis of Therapeutics***.New York: Mc Graw Hill, 2001. p.193-213.

TELIVUO L, KATZ RL. The effects of modern intravenous local analgesics on respiration during partial neuromuscular block in man. ***Anaesthesia***, 1970; 25:30-35.

THESLEFF S. The mode of neuromuscular block caused by acetylcholine, nicotine, decamethonium and succinylcholine. ***Acta Phisiol Scand***, 1955a; 34: 218-231.

THESLEFF S. The effects of acetylcholine, decamethonium and succinylcholine on neuromuscular transmission in the rat. ***Acta Phisiol Scand***, 1955b; 34: 386-392.

TOFT P, KIRKEGAARD NIELSEN H, SEVERINSEN I, HELBO-HANSEN HS. Effect of epidurally administered bupivacaine on atracurium-induced neuromuscular blockade. ***Acta Anaesthesiol Scand***, 1990;34:649-652.

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.

USUBIAGA JE, STANDAERT F. The effects of local anesthetics on motor nerve terminals. ***J Pharmacol Exp Ther***, 1968;159:353-361.

WALI FA. Effect of lignocaine on the responses produced by depolarizing agents at the chick neuromuscular junction. ***Acta Anaesthesiol Scand***, 1984;28:372-376.

WAUD BE. Neuromuscular blocking agents in advances in anesthesia. In: GALLAGHER TJ. ***Advances in Anesthesia***. Chicago:, vol.1, Year Book Medical Publishers,1984. p.337-382.

VIANNA PG. Anestésicos locais.In: BRAZ JRC, CASTIGLIA YM. ***Temas de Anestesiologia.*** São Paulo:Editora UNESP,1992. p.88-101.

VIGBY-MOGENSEN J, KLEWICKA MM, JENSEN NH,ENGBAECK J, ORDING H, SUKOUGAARD LT, CHAEMMER-JORGENSEN B. Tactile and visual evaluation of the response to train of four nerve stimulation. ***Anesthesiology,*** 1985;63:440-443.

VITAL BRAZIL O, SEBA RA, CAMPOS JS. Propriedades curarizantes dos alcalóides álcali-insolúveis metilados dos Chondrodendron platyphyllum. ***Bol Inst Vital Brazil,*** 1944; 26:8.

VITAL BRAZIL O. Ação Neuromuscular da Peçonha de Micrurus. ***O Hospital***, 1965;183-224.

VITAL BRAZIL O. Farmacologia da Junção Neuromuscular. In: CORBETT CE. ***Farmacodinâmica***. São Paulo: Artes Médicas.1973. p.128-150.

VITAL BRAZIL O, FONTANA MD, HELUANY NF. Effect of 4-aminopyridine on the neuromuscular blockade produced by crotoxin. ***Toxicon***,1979;17: 16.

VITAL BRAZIL O, FONTANA MD. Effect of 4- Aminopirydine on the desensitization of the rat diaphragm caused by carbachol. In: LECHAT P et al. ***Aminopyridines and similarly acting drugs; effects on nerves muscles and synapses***. Oxford, Pergamon. 1982, p.240.

VITAL BRAZIL O, FONTANA MD, PAVANI NJ. Effect of 4-aminopyridine on the postsynaptic action of polymyxin B. ***Eur J Pharmacol***, 1989;159:47-51.

YAGIELA, J.A. Anestésicos locais. In: NEIDLE, E.A., KROEFER, D.C., YAGIELA, J.A. ***Farmacologia e terapêutica para dentistas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983, p. 185-198.

YEH JZ, OXFORD GS, WU CH, NARAHASHI T. Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. ***Biophys J***, 1976;16:77-81.

YORUKOGLU D, ASIK Y, OKTEN F. Rocuronium combined with iv. lidocaine for rapid tracheal intubation. ***Acta Anaesthesiol Scand***, 2003;47:583-587.

ZANINI AL, OGA S. Anestésicos locais. In:GONÇALVES B. ***Farmacologia Aplicada***. 4ed. São Paulo:Atheneu,1989.p.91-92.

**** Adotada Normalização Vancouver***

8- ANEXOS

ANEXO 1- COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – IB – UNICAMP – PROTOCOLO Nº 885-2

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **885-2** sobre **"INFLUÊNCIA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS NO BLOQUEIO NEUROMUSCULAR PRODUZIDO POR DIFERENTES BLOQUEADORES NEUROMUSCULARES: ESTUDO EXPERIMENTAL"** sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Angélica de Fátima Assunção Braga / Yolanda Christina de Sousa Loyola** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04 de outubro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **885-2** entitled **"INFLUENCE OF LOCAL ANAESTHETICS IN NEUROMUSCULAR BLOCKADE PRODUCED BY DIFFERENTS BLOCKERS: EXPERIMENTAL STUDY"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on October 4, 2005.

Campinas, 04 de outubro de 2005.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA DEFERINO NAR
CEP 13.083-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 3788 6359
FAX 55 19 [illegible]

ANEXO 2- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

RESOLUÇÃO Nº 592, DE 26 DE JUNHO DE 1992

Enquadra as Entidades obrigadas a registro na Autarquia: CFMV-CRMVs, dá outras providências, e revoga as Resoluções nºs 80/72; 182/76; 248/79 e 580/91.

Princípios éticos na experimentação animal

A evolução contínua das áreas de conhecimento humano, com especial ênfase àquelas de biologia, medicinas humana e veterinária, e a obtenção de recursos de origem animal para atender necessidades humanas básicas, como nutrição, trabalho e vestuário, repercutem no desenvolvimento de ações de experimentação animal, razão pela qual se preconizam posturas éticas concernentes aos diferentes momentos de desenvolvimento de estudos com animais de experimentação.

Postula-se:

Artigo I - É primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona.

Artigo II - Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvaguardar das manobras experimentais e da dor que possam causar.

Artigo III - É de responsabilidade moral do experimentador a escolha de métodos e ações de experimentação animal

Artigo IV - É relevante considerar a importância dos estudos realizados através de experimentação animal quanto a sua contribuição para a saúde humana em animal, o desenvolvimento do conhecimento e o bem da sociedade.

Artigo V - Utilizar apenas animais em bom estado de saúde.

Artigo VI - Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos "in vitro", utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.

Artigo VII - Utilizar animais através de métodos que previnam desconforto, angústia e dor, considerando que determinariam os mesmos quadros em seres humanos, salvo se demonstrados, cientificamente, resultados contrários.

Artigo VIII - Desenvolver procedimentos com animais, assegurando-lhes sedação, analgesia ou anestesia quando se configurar o desencadeamento de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralizantes e não anestésicos.

Artigo IX - Se os procedimentos experimentais determinarem dor ou angústia nos animais, após o uso da pesquisa desenvolvida, aplicar método indolor para sacrifício imediato.

Artigo X - Dispor de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies animais mantidas para experimentação ou docência.

Artigo XI - Oferecer assistência de profissional qualificado para orientar e desenvolver atividades de transportes, acomodação, alimentação e atendimento de animais destinados a fins biomédicos.

Artigo XII - Desenvolver trabalhos de capacitação específica de pesquisadores e funcionários envolvidos nos procedimentos com animais de experimentação, salientando aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Fazenda Lagoa Bonita, Chácara 13CP. 08287 - CEP. 73.301-970 - Planaltina-DF
Tel./Fax. (061) 488-1018
cobea@uol.com.br

ANEXO 3- PROCESSO EDITORIAL RBA-353/05

Sociedade Brasileira de Anestesiologia

São Paulo, 19 de dezembro de 2005

Ilma. Sra.
Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga
Rua Luciano Venere Decourt, 245
Cidade Universitária
13084-040 Campinas, SP

Ref.: **"Influência da Lidocaína no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Rocurônio. Estudo em Preparação Nervo Frênico Diafragma de Rato".**

Prezada Dra. Angélica

Resultado da análise do artigo acima referenciado:

Título
- Adequado, sugiro unir com hífen **Nervo Frênico-Diafragma de Rato**.

Introdução
- Adequada, com correções de português.

Método
- Adequado com correções, relativas à padronização de unidades de medida e português.

Discussão
- Adequada com correções de português.

Resumo
- Deve ser reduzido para 270 palavras.

Figuras
- Devem ser encaminhadas em arquivo separado do texto, de acordo com as especificações das Normas aos autores.

Referências
- Estão adequadas.

Conclusões
O trabalho é muito bom e foi aceito para publicação, com a observação condicional de encaminhamento de texto e figuras em arquivos separados. As correções sugeridas poderão ser verificadas pelos autores no texto que lhes será encaminhado na prova final, antes da impressão.

Atenciosamente

Dra. Judymara Lauzi Gozzani
Editor Chefe

Revista Brasileira de Anestesiologia – Dra. Judymara Lauzi Gozzani - Editor Chefe
Rua Afonso de Freitas, 419 – Cj 5 – Paraíso CEP 04006-052 São Paulo, SP
Fone/Fax **(11) 3559-7625** – E-mail - **rbaneste@terra.com.br**

ANEXO 4- ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO – RBA

Influência da Lidocaína no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Rocurônio. Estudo em Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Rato.

The Influence of Lidocaine on Neuromuscular Blockade Produced by Rocuronium. A Study in a Phrenic Nerve-Diaphragm Preparation on the Rat.

Yolanda Christina S. Loyola [1], Angélica de Fátima de Assunção Braga, TSA[2], Franklin Sarmento da S. Braga [3], Glória Maria Braga Potério, TSA[2], Silmara Rodrigues de Sousa [1], Samanta Cristina Antoniassi Fernandes [1].

1. Aluna do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da FCM da UNICAMP.
2. Profª Associada. do Departamento de Anestesiologia da FCM da UNICAMP.
3. Prof. Dr. do Departamento de Anestesiologia da FCM da UNICAMP

* Recebido do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Campinas, SP

Apresentado em

Aceito para publicação em

Endereço para correspondência:
Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga
Rua Luciano Venere Decourt, 245
Cidade Universitária
13084-040 Campinas, SP
E-mail: franklinbraga@terra.com.br

RESUMO

Loyola YCS, Braga AFA, Braga FSS, Potério GMB, Sousa SR, Fernandes SCA – Influência da Lidocaína no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Rocurônio. Estudo em Preparação Nervo Frênico Diafragma de Rato.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: O mecanismo de ação dos anestésicos locais (AL) na junção neuromuscular motivou a realização de vários estudos. Em baixas doses eles não interferem na transmissão neuromuscular, altas doses podem comprometer a transmissão neuromuscular e potencializar os efeitos de bloqueadores neuromusculares. O objetivo do estudo foi avaliar em diafragma de rato, a interação da lidocaína com o rocurônio através da influência no grau de bloqueio neuromuscular.

MÉTODO: Foram utilizados ratos, com peso entre 250 a 300 g. A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por Bulbring. Formaram-se grupos (n = 5) de acordo com a droga em estudo: lidocaina – 20 $\mu g.mL^{-1}$ (Grupo I); rocurônio – 4 $\mu g.mL^{-1}$ (Grupo II) e rocurônio – 4 $\mu g.mL^{-1}$ com lidocaína – 20 $\mu g.mL^{-1}$ (Grupo III). Avaliou-se: 1) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 60 minutos após a adição da lidocaína e do bloqueador neuromuscular; 2) os potenciais de membrana (PM) e potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM); 3) a eficácia da neostigmina e 4) aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular.

RESULTADOS: A lidocaína isoladamente não alterou a amplitude das respostas musculares. Com uso prévio de lidocaína o bloqueio neuromuscular do rocurônio foi de 82,8 ± 1,91%, com diferença significativa (p = 0,0079) em relação ao grupo com rocurônio isolado (57,8 ± 1,9%). O bloqueio foi parcial e totalmente revertido pela neostigmina e 4 aminopiridina, respectivamente. A lidocaína não alterou o potencial de membrana e ocasionou aumento inicial na freqüência dos PPTM, seguido de bloqueio.

CONCLUSÕES: A lidocaína potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio. As alterações do PPTM identificam ação pré-sináptica. O antagonismo completo da 4 aminopiridina sugere componente pré-sináptico, idéia que é suportada pelo antagonismo parcial pela neostigmina.

Unitermos: ANESTÉSICOS, Local: lidocaína; BLOQUEADORES NEUROMUSCULARES, Não - despolarizantes: rocurônio

Loyola YCS, Braga AFA, Braga FSS, Potério GMB, Sousa SR, Fernandes SCA – Influência da Lidocaína no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Rocurônio. Estudo em Preparação Nervo Frênico Diafragma de Rato.

Introdução

As propriedades farmacológicas dos bloqueadores neuromusculares (BNM), tais como início de ação, grau de bloqueio neuromuscular e duração de ação dependem de vários fatores. Estes incluem o débito cardíaco, o tempo circulatório para o músculo, o fluxo sanguíneo muscular, a afinidade pelo local de ação, a potência e a dose administrada [1]. Também existem evidências de que altas doses de anestésicos locais empregadas isoladamente podem comprometer a transmissão neuromuscular, e potencializar o bloqueio neuromuscular produzido por baixas doses de bloqueadores neuromusculares não-despolarizantes e despolarizantes [2].

Os anestésicos locais, particularmente as amino-amidas, tais como a lidocaína e a bupivacaína, são fármacos comumente empregados na prática clinica em anestesia peridural associada a anestesia geral. Por via venosa, a lidocaína é usada durante a indução anestésica para atenuar as respostas reflexas desencadeadas pelas manobras de laringoscopia e intubação traqueal, e como droga auxiliar no tratamento de disritmias cardíacas no intra-operatório [2-7]. O rocurônio é um bloqueador neuromuscular não-despolarizante, aminoesteróide, de duração de ação intermediária, com início rápido de ação, característica que o diferencia dos demais bloqueadores não-despolarizantes e o torna um agente alternativo para a succinilcolina em situações de indução de seqüência rápida [7-9].

São admitidos vários mecanismos para explicar a interação entre os anestésicos locais e os bloqueadores neuromusculares, tais como ação pré-sináptica, inibindo a liberação da acetilcolina e ação pós-sináptica, através da estabilização da membrana pós-juncional, além de interferência com o mecanismo de excitação-contração da fibra muscular [10-14].

Trabalhos apontam para possível interação lidocaína - bloqueadores neuromusculares, potencializando os efeitos dos bloqueadores neuromusculares [4,10]. 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, necessitando-se de observação cuidadosa quando do emprego simultâneo destes agentes, ou em situações em que a margem de segurança da transmissão neuromuscular estiver reduzida [2,15].

O objetivo deste estudo foi avaliar, em modelo experimental, o efeito da lidocaína na transmissão neuromuscular e a sua influência no bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio.

Método

Foi realizado estudo experimental obedecendo aos princípios éticos do 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 (UNICAMP).

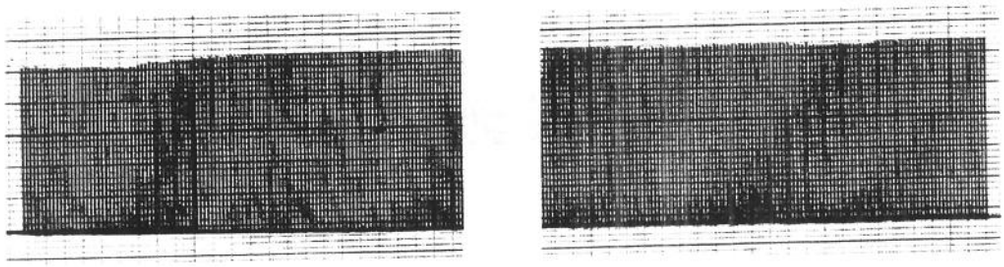
Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 250 e 300 g sacrificados sob anestesia com hidrato de cloral a 10% (250 $mg.kg^{-1}$, via intraperitonial), e sangria por secção dos vasos do pescoço. A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por Bulbring[16]. Os hemidiafragmas com os nervos frênicos correspondentes foram retirados e fixados em cuba contendo 40 mL de solução nutritiva de Tyrode com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $NaHCO_3$ 11,9; $MgCl_2$ 0,25; NaH_2PO_4 0,3 e glicose 11. A solução foi aerada constantemente com carbogênio (95% O_2 + 5% CO_2) 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 (5,0 g), através de fio ligado a transdutor isométrico *Load Cell* BG50 GMS, e submetido à estimulação indireta de 0,1 Hz de freqüência e duração de 0,2 mseg, sendo que as variações de tensão produzidas pelas contrações do diafragma foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400. Formaram-se grupos (n = 5), de acordo com o fármaco adicionado à preparação: Grupo I - lidocaína (20 $\mu g.mL^{-1}$); Grupo II - rocurônio (4 $\mu g.mL^{-1}$); Grupo III - rocurônio (4 $\mu g.mL^{-1}$) em preparação previamente exposta à lidocaína (20 $\mu g.mL^{-1}$). No Grupo III (lidocaína-rocurônio), o rocurônio foi adicionado à preparação 30 minutos após a adição da lidocaína. As respostas musculares à estimulação indireta foram registradas durante 60 minutos após a adição dos fármacos. Para a reversão do bloqueio neuromuscular ocasionado pela associação lidocaína-rocurônio, empregaram-se neostigmina (2 $\mu g.mL^{-1}$) e a 4 aminopiridina - 4AP (20 $\mu g.mL^{-1}$), adicionadas à preparação 60 minutos após o BNM. Utilizou-se também a preparação nervo frênico-diafragma para a o estudo dos efeitos da lidocaína nos potenciais de placa terminal em miniatura e nos potenciais de membrana. Foram avaliados: 1) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 60 minutos após a adição de lidocaína; 2) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação

indireta, antes e 60 minutos após a adição do bloqueador neuromuscular; 3) os potenciais de membrana (PM) e potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM); 4) a eficácia da neostigmina e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular.

Os resultados foram expressos em média e desvios-padrão. Para análise estatística foram utilizados os testes de Mann-Whitney e de Wilcoxon para amostras pareadas. Assumiu-se nível significativo de 5% ($\alpha = 5\%$). O poder do teste foi calculado e obteve-se $\beta > 20\%$ (poder > 80%).

Resultados

A lidocaína na concentração estudada e empregada isoladamente em preparação nervo frênico-diafragma de rato não causou redução na amplitude das respostas musculares à estimulação elétrica indireta (Figura 1).



A B C

Figura 1 - Efeito da lidocaína (20μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta em preparação nervo frênico - diafragma de rato. **A**: controle; **B**: adição de lidocaína; **C**: 60 minutos após a adição de lidocaína

Nas preparações expostas previamente à lidocaína o bloqueio produzido pelo rocurônio foi de 82,8 ± 1,91%, com diferença significativa (p = 0,0079) em relação ao produzido pelo rocurônio empregado isoladamente (57,8 ± 11,9%) - Figuras 2 e 3, respectivamente.

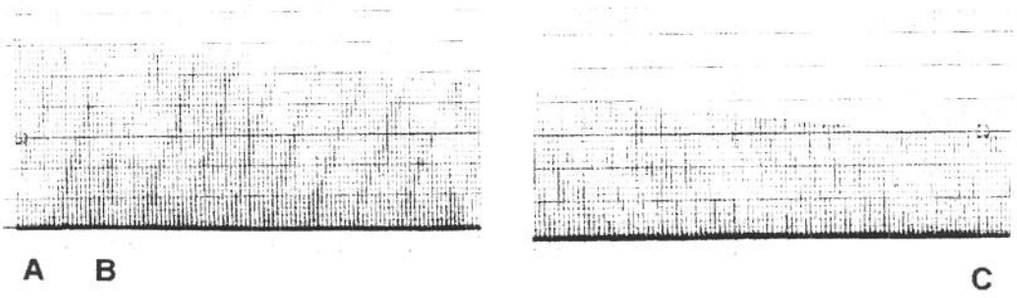


Figura 2 - Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta em preparação nervo frênico - diafragma de rato. **A**: controle; **B:** adição do rocurônio; **C**: 60 minutos após a adição de rocurônio

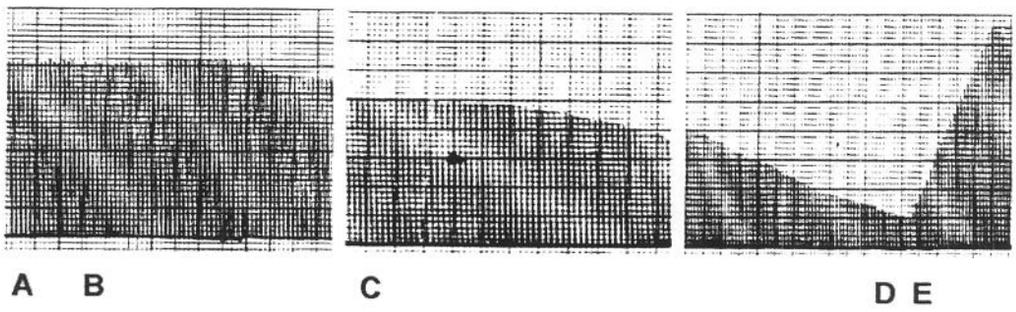


Figura 3 - Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta em preparação nervo frênico - diafragma de rato expostas a lidocaína (20μg/mL). Efeito da 4 aminopiridina. **A**: controle; **B:** adição de lidocaína; **C**: adição de rocurônio 30 minutos após a lidocaína;**D**: 60 minutos após rocurônio; **E**: 4 AP (20μg/mL)

O bloqueio neuromuscular causado pelo rocurônio, nas preparações expostas à lidocaína, foi revertido parcial e totalmente pela neostigmina (Figura 4) e pela 4 - aminopiridina (Figura 3), respectivamente .

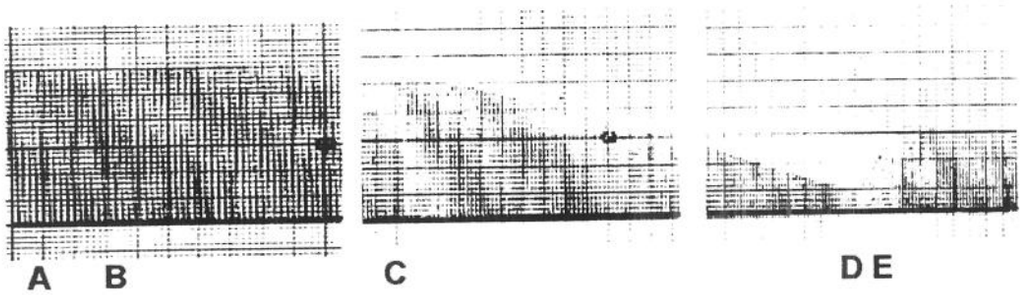


Figura 4 - Efeito do rocurônio (4μg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta em preparação nervo frênico - diafragma de rato expostas a lidocaína (20μg/mL). Efeito da neostgmina. **A:** controle; **B:** adição de lidocaína; **C**: adição de rocurônio 30 minutos após a lidocaína; **D**: 60 minutos após rocurônio; **E**: neostigmina (2μg/mL)

Não se observou efeito com diferença estatisticamente significante da lidocaína sobre os potenciais de membrana. Os efeitos sobre os potenciais de placa terminal em miniatura caracterizaram-se inicialmente por aumento na freqüência, observado 30 minutos após a adição da droga, seguido de bloqueio aos 60 minutos (Figura 5).

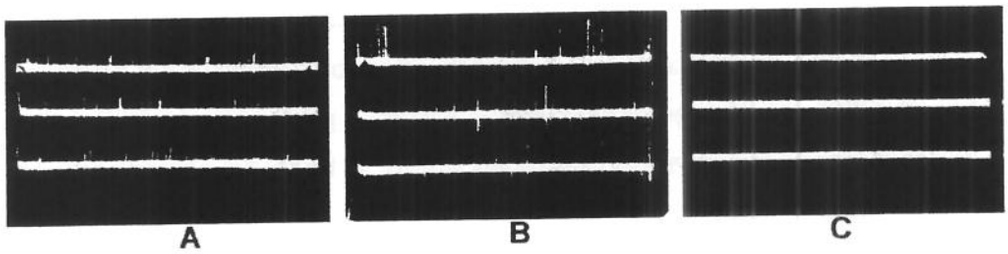


Figura 5 - Efeito da lidocaína (20μg/mL) nos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação nervo frênico - diafragma de rato. **A:** controle; **B:** 30 minutos após a adição de lidocaína, **C:** 60 minutos após a adição de lidocaína

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 observada na prática clínica[2,4-6].

Esses achados clínicos foram confirmados em trabalhos experimentais, que têm como maior vantagem, em relação às pesquisas clínicas, a possibilidade de eliminar a grande variabilidade individual de sensibilidade aos bloqueadores neuromusculares[10,17-19]

BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO
COLEÇÃO
UNICAMP

O presente estudo, realizado em preparação nervo frênico-diafragma de rato, mostrou que na concentração estudada a lidocaína empregada isoladamente não exerceu efeitos na junção neuromuscular, no entanto potencializou o bloqueio produzido pelo rocurônio. Estes resultados assemelham-se aos de outros autores que também relataram ausência de efeito dos anestésicos locais na transmissão neuromuscular, mas observaram potencialização de diferentes bloqueadores neuromusculares, quando do emprego de anestésicos locais por diferentes vias de administração[4-6,10,17,19].

Na década de 1950, Ellis e col.[17], em experimentos realizados em gatos, observaram que a procaína, embora não exercendo efeito na transmissão neuromuscular, intensificou o bloqueio produzido pela d-tubocurarina e succinilcolina, resultados confirmados em outros trabalhos que também relataram ser verdadeira esta interação para outros anestésicos locais e bloqueadores neuromusculares[10,19]. Matsuo e col.[10] avaliaram em preparação nervo frênico-diafragma de rato, a ação da associação da d-tubocurarina a diferentes anestésicos locais como procaína, lidocaína e etidocaína. Observaram que mesmo em concentrações consideradas ineficazes, os anestésicos locais diminuíram de modo significativo a ED_{50} dos agentes bloqueadores neuromusculares e que estes, em concentrações eficazes para causar bloqueio neuromuscular, também causaram similar diminuição da ED_{50} dos anestésicos locais. Assim, os autores concluíram que a interação bloqueadores neuromusculares-anestésicos locais pode ser conseqüente a potencialização verdadeira, causada pela ação dos dois tipos de drogas, em diferentes locais da junção neuromuscular.

Em experimentos realizados em gatos, o bloqueio neuromuscular produzido pela associação lidocaína-pancurônio foi 20% maior, com diferença estatística significativa em relação ao observado quando do emprego do pancurônio isoladamente[18]. Similarmente, a lidocaína na dose de 5 $mg.kg^{-1}$ administrada por via venosa, também aumentou em 25% o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina[19]. No homem, os efeitos do vecurônio e do atracúrio foram prolongados pela bupivacaína administrada no espaço peridural, e o rocurônio teve sua duração farmacológica aumentada pela lidocaína administrada por via venosa[4-6].

A interação entre os anestésicos locais e os bloqueadores neuromusculares não está completamente elucidada, e vários mecanismos podem ser responsáveis pela potencialização observada. Teoricamente estes agentes podem interferir em alguma etapa envolvida na transmissão neuromuscular. Por ação pré-sináptica, os anestésicos locais deprimem seletivamente a condução nas fibras motoras e diminuem a liberação de

acetilcolina durante a estimulação nervosa[12,20-21]. Por ação pós-sináptica podem se ligar a diferentes locais específicos de acetilcolina, resultando em dessensibilização desses receptores, além de poderem ocluir temporariamente os canais dos receptores nicotínicos[13-14,22-23].

A lidocaína pode bloquear completamente a condução nervosa e também deprimir a condução do impulso pré e pós-juncional[24]. Em estudo que correlaciona a estrutura molecular de vários derivados da lidocaína com as suas respectivas propriedades inibitórias da transmissão neuromuscular e com a sua potência anestésica local, foi demonstrado que as propriedades moleculares desses derivados, relacionadas com o comprometimento da transmissão neuromuscular, são similares àquelas envolvidas na ativação de receptores de acetilcolina, e não com as associadas a sua potência anestésica local. Esses resultados sugerem que a lidocaína produz bloqueio neuromuscular por mecanismos distintos do seu mecanismo de ação como anestésico local[24].

O bloqueio neuromuscular ocasionado pela associação lidocaína-rocurônio foi revertido pela neostigmina e pela 4-aminopiridina. A neostigmina foi menos eficaz do que a 4-aminopiridina na reversão do bloqueio. Com esta última, a amplitude das respostas musculares à estimulação do nervo frênico, ultrapassou a das respostas consideradas como controle. A neostigmina, ao inibir a acetilcolinesterase, aumenta a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica sendo capaz de deslocar competitivamente os agentes causadores do bloqueio. A 4-aminopiridina, além do efeito inibidor de dessensibilização de receptores nicotínicos da placa terminal, provoca grande aumento dos quanta de acetilcolina. Esse aumento é resultante de duas ações distintas na membrana das terminações nervosas, 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[25-30]. Embora o mecanismo subsináptico pelo qual a 4-aminopiridina aumenta a liberação do transmissor ainda não esteja completamente elucidado, a eficácia da droga como antagonista do bloqueio neuromuscular pré e pós-sináptico tem sido evidenciada em testes experimentais[10,25-31]. No entanto, seu uso na clínica não é preconizado, pois atravessa facilmente a barreira hematoencefálica com estimulação do sistema nervoso central, podendo causar convulsões[30].

Na avaliação dos potenciais bioelétricos, observou-se que a lidocaína na concentração empregada não altera o potencial de membrana das fibras musculares, demonstrando-se,

portanto, que não possui ação despolarizante sobre a fibra muscular esquelética. Embora a lidocaína não tenha apresentado efeito sobre a fibra muscular, os estudos dos potenciais bioelétricos evidenciaram que este fármaco na concentração empregada, interfere nos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM). Inicialmente verificou-se aumentou na freqüência dos PPTM, o que pode ser atribuído a ação pré-sináptica, aumentando a liberação do neurotransmissor, com redução na amplitude, provavelmente devido a ação pós-sináptica.

Os resultados mostram que a lidocaína na concentração estudada e empregada isoladamente não comprometeu a transmissão neuromuscular, mas potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio. As alterações do potencial de placa terminal em miniatura indicam ação pré-sináptica, modificando a liberação quantal de acetilcolina, a ausência de alterações no potencial de membrana demonstra que nesta concentração a lidocaína não possui ação despolarizante sobre a fibra muscular e que o provável local de ação é na junção neuromuscular, particularmente na placa motora terminal. O antagonismo completo obtido com a 4-aminopiridina sugere que a interação da lidocaína com o rocurônio tem componente pré-sináptico, relacionado à diminuição da liberação de acetilcolina. O antagonismo parcial pela neostigmina suporta esta idéia, uma vez que os anticolinesterásicos são eficazes apenas na reversão do bloqueio pós-sináptico.

É provável que a potência dos anestésicos locais na junção neuromuscular possa diferir entre as diferentes espécies e, embora a extrapolação desses resultados para o homem não seja quantitativamente semelhante, as implicações clínicas dessa interação tornam evidenciam a necessidade de monitorização do bloqueio neuromuscular, e de redução da dose de bloqueadores neuromusculares quando do uso simultâneo desses agentes.

Referências

01. Donati F - Onset of action of relaxants. Can J Anaesth, 1988; 35:S52-58.

02. Telivuo L, Katz RL - The effects of modern intravenous local analgesics on respiration during partial neuromuscular block in man. Anaesthesia, 1970; 25:30-35.

03. Hamaya Y, Dohi S - Differences in cardiovascular response to air-way stimulation at different sites and blockade of the response by lidocaine. Anesthesiology, 2000; 93:95-103.

04. Cardoso LSM, Martins CR, Tardelli MA - Efeitos da lidocaína por via venosa sobre a farmacodinâmica do rocurônio. Rev Bras Anestesiol, 2005; 55:371-380.

05. Toft P, Kirkgaard Nielsen H, Severinsen I et al - Effect of epidurally administered bupivacaíne on atracurium-induced neuromuscular blockade. Acta Anaesthesiol Scand, 1990; 34: 649-652.

06. Taivainen T, Meretoja OA, Rosenberg PH - The effect of epidural bupivacaine on vecuronium-induced neuromuscular blockade in children. Acta Anaesthesiol Scand, 1994; 38: 453-456.

07. Yorukoglu D, Asik Y, Okten F. Rocuronium combined with iv lidocaine for rapid tracheal intubation. Acta Anaesthesiol Scand, 2003; 47:583-587.

08. Engbaek J, Mogensen JV - Can rocuronium replace succinylcholine in a rapid-sequence induction of anaesthesia? Acta Anaesthesiol Scand, 1999; 43:1-3.

09. Andrews JI, Kumar N, Van Den Brom RHG et al - A large simple randomized trial of rocuronium versus succinylcholine in rapid-sequence induction of anaesthesia along with propofol. Acta Anaesthesiol Scand, 1999; 43:4-8.

10. Matsuo S, Rao DB, Chaudry I et al - Interaction of muscle relaxants and local anesthetics at the neuromuscular junction. Anesth Analg, 1978; 57:580-587.

11. 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.

12. Straughan DW - The action of procaine at the neuromuscular junction. J Pharm Pharmacol, 1971; 41: 94-104.

13. Sine MS, Taylor P - Local anesthetics and histrionicotoxin are allosteric inhibitors of the acetylcholine receptor. J Biol Chem, 1982; 257: 8106-8114.

14. Neher E, Steinback JH - Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. J Physiol, 1978; 277: 153-176.

15. Pedemeiras SG - Interação de Drogas com relaxantes musculares. Rev Bras Anestesiol, 1988; 38:63-73.

16. Bulbring E. Observation on the isolated phyrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. Br J Pharmacol, 1946; 1:38-61.

17. 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: 277-282.

18. Carpenter RL, Mulroy MF - Edrophonium antagonize combined lidocaíne-pacuronium and verapamil-pancuronium neuromuscular blockade in cats. Anesthesiology, 1986; 65:506-510.

19. Harrah MD, Way WL, Katzung BG - The interaction of d-tubocurarine with antiarrhythmic drugs. Anesthesiology, 1970; 33:406-410.

20. Matthews EK, Quilliam JP - Effects of central depressant drugs upon acetylcholine release. Br J Pharmacol, 1964; 22: 415-440.

21. Usubiaga JE, Standaert F - The effects of local anesthetics on motor nerve terminals. J Pharmacol Exp Ther, 1968;159:353-361.

22. Ruff RL - The kinetics of local anesthetic blockade of end-plate channels. Biophys J, 1982;37:625-631.

23. Cohen JB, Boyd ND, Shera NS - Interactions of anesthetics with nicotinic postsynaptic membranes isolated from torpedo electric tissue. In: Fink BR - Molecular mechanisms of anesthesia. Progress in Anesthesiology. New York: Raven Press, 1980: 165-174.

24. Steinbach AB - Alteration of xylocaine (lidocaine) and its derivatives of the time course of the end plate potencial. J Gen Physiol, 1968; 52: 144-161.

25. Yeh JZ, Oxford GS, Wu CH et al - Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. Biophys J, 1976;16:77-81.

26. 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.

27. Brazil OV, Fontana MD, Pavani NJ - . Effect of 4-aminopyridine on the postsynaptic action of polymyxin B. Eur J Pharmacol, 1989;159:47-51.

28. Vital Brazil O, Fontana MD, Pavani NJ - Effect of 4-aminopyridine on end-plate receptor desensitization caused by carbachol. Eur J Pharmacol, 1982;86:199-205.

29. Harvey AL, Marshall IG - The facilitatory actions of aminopyridines and tetraethylammonium on neuromuscular transmission and muscle contractility in avian muscle. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1977;299:53-60.

30. Harvey AL, Marshall IG - The actions of three diaminopyridines on the chick biventer cervicis muscle. Eur J Pharmacol, 1977;44:303-309.

31. Bowman WC, Harvey AL, Marshall IG - The actions of aminopyridines on avian muscle. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1977;297:99-103.

ANEXO 5- PROCESSO EDITORIAL MEDVEP - 00229

Curitiba, 3/1/2006

Yolanda Christina Loyola

Ref.: Aprovação de artigo para publicação **(00229)**

Prezada Srta.:

Informamos que o artigo **INFLUÊNCIA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS NO BLOQUEIO NEUROMUSCULAR PRODUZIDO PELA D-TUBOCURARINA. ESTUDO EM PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO,** encaminhado ao Corpo Científico, recebeu parecer favorável para publicação na revista **MEDVEP**, em espaço e data a serem definidos, conforme critérios editoriais. Adiantamos que quando o artigo for publicado, a Bio Editora encaminhará um exemplar para cada autor, da respectiva edição.

Agradecemos a deferência pela escolha de nossa Editora para envio de seu trabalho, ressaltando que nos sentiremos honrados em receber outros artigos, para futuras publicações.

Atenciosamente,

Marilene C Bloot
Edição
edicao@bioeditora.com.br

Rua Ten Francisco F de Souza, 3636 – Boqueirão – CEP 81670-010 – Curitiba – PR - Tel. (41) 3278-5166/ 3276-7000

ANEXO 6- ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO – MEDVEP

INFLUÊNCIA DOS ANESTÉSICOS LOCAIS NO BLOQUEIO NEUROMUSCULAR PRODUZIDO PELA D-TUBOCURARINA. ESTUDO EM PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO – DIAFRAGMA DE RATO.

THE INFLUENCE OF LOCAL ANAESTHETICS ON NEUROMUSCULAR BLOCKADE PRODUCED BY D-TUBOCURARINE. A STUDY IN A PHRENIC NERVE-DIAPHRAGM PREPARATION ON THE RAT.

1. Yolanda Christina S Loyola – Profa. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade José do Rosário Velano – UNIFENAS. Aluna do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

2. Angélica de Fátima de Assunção Braga - Profa. Associada do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP - TSA

3. Glória Maria Braga Potério - Profa. Associada do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP – TSA

4. Franklin Sarmento da Silva Braga - Prof. Dr. do Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP

5. Silmara Rodrigues de Sousa - Aluna do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

6. Samanta Cristina Antoniassi Fernandes - Aluna do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

7. Thalita Duque Martins - Mestre em Farmacologia pela FCM - UNICAMP

Trabalho realizado no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Rua Pessalia Vieira de Camargo, 126. Campinas – SP. CEP 13084971. Tel.(19) 37889531.

RESUMO

Trata-se de estudo experimental com o objetivo de estudar em preparação nervo frênico-diafragma de rato (NFD), a influência da procaína e lidocaína no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina.

Foram utilizados ratos Wistar com peso entre 250 a 300g sacrificados sob anestesia com pentobarbital sódico por via peritoneal. A preparação NFD foi montada de acordo com a técnica de Bulbring; a preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado (HCD) com a finalidade de observar a ação pós-sinaptica dos anestésicos locais ou uma possível ação na fibra muscular, de acordo ao proposto por Vital Brazil (1965)

Em preparação nervo frênico-diafragma de ratos, a procaína, a lidocaína e a d-tubocurarina nas concentrações estudadas e empregadas isoladamente não causaram alteração na amplitude das respostas musculares. Em preparações expostas previamente a procaína e a lidocaína, o bloqueio produzido pela d-tubocurarina foi de 75,2% e de 63,2%, respectivamente. Os anestésicos locais não alteraram o potencial de membrana demonstrado que não atuam na fibra muscular e o local de ação é na junção neuromuscular particularmente na placa motora. Na preparação HCD a procaína e a lidocaína produziram diminuição significativa de 52,7% e 19,3%, respectivamente na resposta a acetilcolina, demonstrando o efeito pós-juncional das drogas. Os anestésicos locais apresentaram efeito pré-sinaptico, evidenciado por alterações nos potenciais em miniatura da placa terminal. O bloqueio ocasionado pela associação anestésico local-d-tubocurarina foi antagonizado parcialmente pela neostigmina. A procaína e a lidocaína nas concentrações empregadas potencializaram o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina.

Palavras chaves: ANESTÉSICOS LOCAIS: procaína, lidocaina; **BLOQUEADORES NEUROMUSCULARES**: d-tubocurarina; **INTERAÇÃO**.

ABSTRACT

It is treated of na experimental study with the objective of studyng in a phrenic nerve-diaphragm preparation on the rat (NFR), the influence of the procaine and lidocaine in the blockade neuromuscular produced by the d-tubocurarine.

Wistar rat were used with weight among 250 to 300g sacrificed under anesthesia with pentobarbital 10%. The preparation NFD was set up in agreement with the Bulbring´s technique; the preparation hemidiafragma of rat chronically nerveless (HCN) with the purpose of observing the action post-junctional of the local anesthetics or a possible action in the muscular fiber of agreement to the proposed by Vital Brazil (1965).

In a phrenic nerve-diaphragm preparation on the rat, the procaine, the lidocaine and the d-tubocurarine in the studied concentrations and used separately didn´t cause alteration in the width of the muscular answers. In preparations previously exposed the procaine and the lidocaine, the blockade produced by the d-tubocurarine was of 75,2% and of 63,2%, respectively. The local anesthetics didn´t alter the potential of membrane demonstrated that they don't act in the muscular fiber and the action place is in the junction neuromuscular particulaly in the motor plate. In the preparation HCN the procaine and the lidocaine produced significant decreaseof 52,7% and 19,3%, respectively in the answer to the acetylcholine demonstrating the effect post-junctional of the drugs. The local anesthetics presented effect pre-synaptic, evidenced by alterations in the potentials in miniature of the terminal plate. The blockade caused by the association anesthetic local-d-tubocurarine was antagonized partially by the neostigmine. The procaine and the lidocaine in the used concentrations potentiated the blockade neuromuscular produced by the d-tubocurarine.

Key words: LOCAL ANESTHETICS: procaine, lidocaine: NEUROMUSCULARS BLOCKADES: d-tubocurarina; INTERACTION.

INTRODUÇÃO

A procaína e a lidocaina são anestésicos frequentemente utilizados na clínica médica veterinária, principalmente a lidocaína, em vários tipos de bloqueios e como agentes antiarrítmicos.

A maioria dos anestésicos locais, podem em altas doses e uso isolado, bloquear a transmissão neuromuscular, no entanto, mesmo quando empregados em baixas doses podem potencializar o bloqueio neuromuscular produzido tanto por bloqueadores neuromusculares não despolarizantes quanto pelos despolarizantes[1].

São admitidos vários mecanismos para explicar essa interação descrevendo-se ação pré-sináptica como a inibição da liberação da acetilcolina e ação pós-sináptica como estabilização da membrana pós-juncional, além da interferência com o mecanismo de excitação contração da fibra muscular[2]. Em preparação nervo frênico- diafragma de rato, os anestésicos locais, procaína, lidocaína e etidocaína em concentrações consideradas ineficazes, diminuíram significantemente a ED_{50} da d-tubocurarina, o mesmo também foi observado com os anestésicos locais que tiveram sua ED_{50} diminuída quando do emprego de bloqueadores neuromusculares (BNM) em concentrações ineficazes para causar bloqueio neuromuscular. A interação bloqueadores neuromusculares – anestésicos locais pode dever-se a uma potencialização verdadeira causada pela ação dos dois tipos de drogas, em diferentes sítios da junção neuromuscular [2].

Os BNM também são fármacos amplamente utilizados na prática anestésica e o uso clínico dos diferentes tipos de BNM tem sido parte integral e crescente na anestesia clínica. Apresentam em sua estrutura um ou mais grupos de amônio quaternário, carregados positivamente, que se ligam as subunidades alfa do receptor nicotínico na placa motora, mimetizando a ação da acetilcolina causando despolarização antes da paralisia ou impedindo o acesso da acetilcolina ao receptor evitando a despolarização [3-5].

A d-tubocurarina constitui o protótipo dos bloqueadores neuromusculares adespolarizantes, com interesse histórico e uso em pesquisas experimentais. É um bloqueador com potência relativamente baixa (DE_{95} = 0,5mg.kg^{-1}), longa

duração de ação e efeitos colaterais, decorrentes da ação bloqueadora ganglionar e da liberação de histamina[4-5].

Embora somente em altas doses os anestésicos locais possam produzir bloqueio neuromuscular, a interação com os bloqueadores neuromusculares, particularmente os adespolarizantes, torna-se clinicamente relevante, necessitando de observação cuidadosa quando do emprego simultâneo destas drogas, ou em situações em que a margem de segurança da transmissão neuromuscular estiver reduzida[6].

O presente estudo através de experimentos específicos na junção neuromuscular teve como objetivo estudar a ação dos anestésicos locais procaína e lidocaína na junção neuromuscular e sua influência no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina, uma vez que técnicas de anestesia geral incluem a utilização destes dois grupos de drogas.

REVISÃO DE LITERATURA

Na década de 50, Ellis et al.[7], em experimentos realizados em gatos, observaram que a procaína embora não exerça efeito na transmissão neuromuscular, intensifica o bloqueio produzido pela d-tubocurarina e succinilcolina, resultados confirmados em outros trabalhos que também relataram ser verdadeira esta interação para outros anestésicos locais e bloqueadores nuromusculares [2,8].

Hirst e Wood (1971)[9] estudaram a ação da procaína em preparação nervo-frênico-diafragma isolado de ratos submetida a baixas freqüências de estimulação e relataram resposta semelhante a produzida pela d-tubocurarina, concluindo assim que esse efeito resulta de alteração na sensibilidade da membrana pós-juncional ao neurotransmissor, e não em sua liberação. No entanto, a estimulação do nervo frênico com altas freqüências produz redução na excitabilidade elétrica do terminal nervoso, com ausência de resposta. Esta pode ser considerada uma distinta forma de depressão pré-juncional, resultado já relatado anteriormente por Straughan[10].

Maeno et al.[11] descreveram que a procaína, lidocaína e seus derivados deprimem e modificam a resposta dos receptores pós-sinápticos da junção neuromuscular para a acetilcolina, achados já relatados anteriormente por Steibach (1968)[12] que sugeriu que o local de ação destas substâncias é o mesmo da d-tubocurarina, ou seja os receptores pós-sinápticos.

Alguns autores, estudaram em preparação NFD os efeitos da lidocaína e d-tubocurarina e observaram aumentado bloqueio neuromuscular, que foi atribuído ao fato da lidocaína bloquear a condução nas terminações nervosas motoras, com prejuízo na liberação de acetilcolina (efeito pré-sinaptico), além de inibir a despolarização da membrana pós-juncional devido ao bloqueio dos canais de sódio e potássio[13].

Em experimentos realizados em gatos, o bloqueio neuromuscular produzido pela associação lidocaína-pancurônio foi 20% maior, e estatisticamente significante, em relação ao observado quando do emprego do pancurônio isoladamente[14]. Similarmente, a lidocaína na dose de 5mg/kg administrada por via venosa, também aumentou em 25% o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina[8]. Outros estudos demonstraram que os anestésicos locais administrados como agentes antiarrítmicos durante ou no pós-operatório podem aumentar o bloqueio residual[1].

A lidocaína pode bloquear completamente a condução nervosa e também deprimir a condução do impulso ao nível pré e pós-juncional[12]. Em estudo que correlaciona a estrutura molecular de vários derivados da lidocaína com as suas respectivas propriedades inibitórias da transmissão neuromuscular e com sua potência anestésica local, foi demonstrado que as propriedades moleculares desses derivados, relacionadas com o comprometimento da transmissão neuromuscular, são similares aquelas envolvidas na ativação de receptores de acetilcolina, e não com as associadas a sua potencia anestésica local. Esses resultados podem sugerir que a lidocaína produz bloqueio neuromuscular por mecanismo distintos do seu mecanismo de ação como anestésico local [12].

A interação entre os anestésicos locais e os bloqueadores neuromusculares não está completamente elucidada, e vários mecanismo podem ser responsáveis pela

potencialização dos efeitos dos relaxantes musculares pelos anestésicos locais. Teoricamente estas drogas podem interferir em alguma etapa envolvida na transmissão neuromuscular. Pré-sinápticamente, os anestésicos locais deprimem seletivamente a condução nas fibras terminais motoras e diminuem a liberação de acetilcolina durante estimulação nervosa[10,15] e pós-sinápticamente podem se ligar a diferentes sítios específicos de acetilcolina resultando em dessensibilização desses receptores, além de poder ocluir transitoriamente os canais dos receptores nicotínicos[16-17].

A possível interação entre drogas como anestésicos locais e bloqueadores neuromusculares evidenciadas em estudos experimentais, podem estar presentes na prática clínica quando do uso simultâneo dessas drogas, com comprometimento da transmissão neuromuscular que pode causar prejuízo na respiração espontânea e necessitar de assistência ventilatória prolongada.

MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de estudo experimental 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 (UNICAMP).

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar com peso entre 250 e 300g. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico por via intraperitoneal e após sangria por secção dos vasos do pescoço, foi retirado o hemidiafragma esquerdo e a porção do nervo frênico correspondente e a preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por Bulbring (1946)[18]. A preparação foi fixada em cuba contendo 40 ml de solução nutritiva de Tyrode com a seguinte composição mM: NaCl 137; KCl 2,7; $CaCl_2$ 1,8; $NaHCO_3$ 11,9; $MgCl_2$ 0,25; NaH_2PO_4 0,3 e glicose 11. A solução foi aerada constantemente com carbogênio (95% O_2 + 5% CO_2) 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 (5,0) através de um fio ligado a um trnsdutor isométrico Load

Cell BG50 GMS, e submetido à estimulação indireta de 0,1Hz de frequência e duração de 0,2 mseg e as variações de tensão produzidas pelas contrações do diafragma foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400.

Formaram-se grupos (n=5) de acordo com a droga adicionada a preparação: Grupi I - procaína (40μg/ml); Grupo II - lidocaína (20μg/ml); Grupo III - d-tubocurarina (0,3μg/ml); Grupo IV - procaína e d-tubocurarina; Grupo V - lidocaína e d-tubocurarina, Nos grupos em que a preparação foi previamente exposta ao anestésico local, a d-tubocurarina foi adicionada a preparação 30 minutos após.

As respostas musculares a estimulação indireta foram registradas durante 60 minutos após a adição das drogas. Para a reversão do bloqueio neuromuscular ocasionado pela associação procaína - d-tubocurarina e lidocaína - d-tubocurarina, empregou-se neostigmina (2μg/ml), adicionada a preparação 60 minutos após o BNM. Utilizou-se também a preparação NFD para o estudo dos efeitos da procaína e da lidocaína nos potenciais de placa terminal em miniatura e nos potenciais de membrana. Foram avaliados: 1) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 60 minutos após a adição dos anestésicos locais; 2) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 60 minutos após a adição da d-tubocurarina; 3) os efeitos dos anestésicos locais nos potenciais de membrana (PM) e potenciais de placa terminal em miniatura (pptm); 4) a eficácia da neostigmina na reversão do bloqueio neuromuscular.

A preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado (n=5) foi utilizada segundo a técnica descrita por Vital Brazil (1965)[19]. O procedimento iniciou-se após a anestesia do rato posicionando-o em decúbito lateral direito; realizou-se incisão de 0,5 cm perpendicular a linha mediana do terço inferior da região lateral do tórax esquerdo. Com extensão de aproximadamente 1,5 cm cortou-se os músculos intercostais e com um bastão de vidro com extremidade recurvada, prendeu-se e seccionou-se o nervo frênico. Suturou-se a pele por meio de dois pontos. Após 15 a 20 dias retirou-se o hemidiafragma esquerdo adotando-se a técnica descrita para nervo frênico-diafragma de rato.

A montagem da preparação, a solução nutritiva, o borbulhamento com carbogênio e o protocolo de registro das contrações do músculo desnervado são iguais aos descritos na técnica anterior. Com auxílio de um estimulador Grass S88, foram aplicados diretamente no músculo estímulos supramaximais de 2ms de duração e 0,1Hz de freqüência, durante 3 minutos para obtenção das respostas musculares (controle); após esse período suspendeu-se à estimulação e adicionou-se na preparação, acetilcolina (5μg/ml), registrando-se a resposta. Quando a contratura atingiu o seu ápice, interrompeu-se o registro do fisiógrafo e a preparação foi lavada com solução nutritiva Tyrode (três sucessivas lavagens), e os anestésicos locais procaína (40μg/ml) ou lidocaína (20μg/ml) foram adicionados separadamente a preparação, aguardou-se 30 minutos. Após esse período foram aplicados estímulos elétricos diretos durante três minutos para obtenção de um outro controle das respostas musculares, a seguir interrompeu-se a estimulação e adicionou-se novamente a acetilcolina (5μg/ml) registrando-se a segunda resposta. O grau de contratura a acetilcolina foi comparado antes e após a adição da procaína e da lidocaína.

Para avaliar a redução das respostas musculares e a eficácia da neostigmina utilizada na reversão do bloqueio neuromuscular utilizou-se o teste de Mann-Whitney. O efeito dos anestésicos locais na resposta contraturante da acetilcolina, e a comparação dos potenciais de membrana antes e após a adição dos anestésicos locais foram avaliados através do teste de Wilcoxon para amostras pareadas. Assumiu-se um nível de significância de 5% (α=5%). O poder do teste foi calculado e obteve-se B>20% (poder >80%). O sofware utilizado para análise dos dados foi o SAS versão 8.2.

RESULTADOS

A procaína, a lidocaína e a d-tubocurarina nas concentrações estudadas e empregadas isoladamente em preparações nervo frênico-diafrgama de ratos, não causaram redução na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta. (Figuras 1,2 e 3).

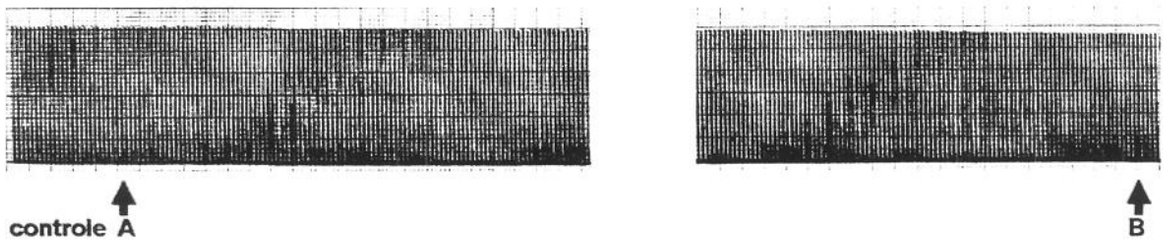


Figura 1. Efeitos da procaína (40μg/ml) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações NFD (n=5). **A**: adição de procaína; **B**: 60 minutos após a adição de procaína.

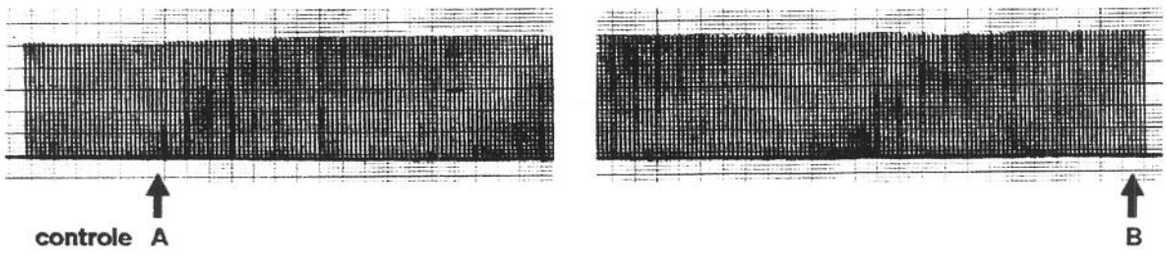


Figura 2. Efeitos da lidocaína (20μg/ml) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações NFD (n=5). **A**: adição de lidocaína; **B**: 60 minutos após a adição de lidocaína.

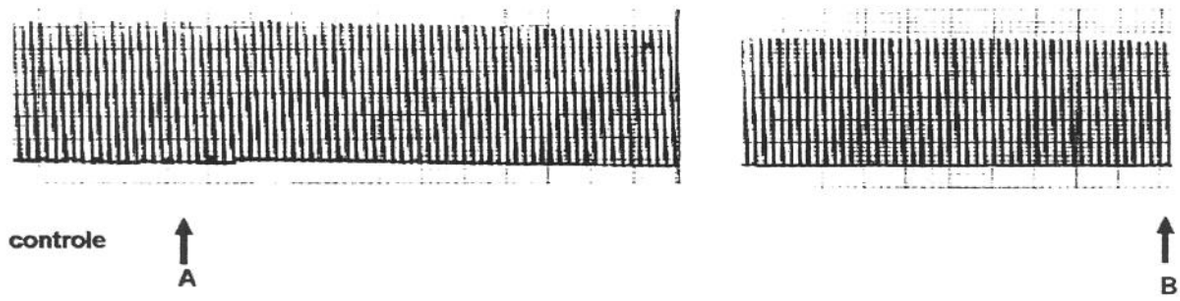


Figura 3. Efeitos da d-tubocurarina (0,3μg/ml) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações NFD (n=5). a: adição de d-tubocurarina; b: 60 minutos após a adição de d-tubocurarina.

A d-tubocurarina (0,3μg/ml) em preparações expostas previamente a procaína promoveu redução de 75,2% ± 6,92 na amplitude das respostas musculares (Figura 4); nas expostas a lidocaína o bloqueio foi de 63,2% ± 4,60 (Figura 5). Este bloqueio foi só parcialmente revertido pela neostigmina (Figuras 4 e 5). A recuperação da amplitude das respostas musculares após a adição da neostigmina, na preparações expostas a procaína e a lidocaína foi cerca de 65,36% ± 11,79 e de 65,0% ± 9,40, respectivamente.

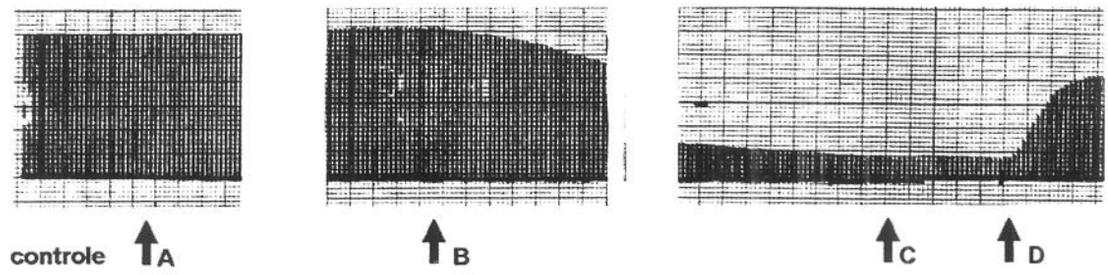


Figura 4. Efeitos da d-tubocurarina (0,3μg/ml) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações NFD previamente expostas a procaína (40μg/ml). Efeito da neostigmina. **A:** adição de procaína; **B:** adição de d-tubocurarina, 30 minutos após exposição à procaína; **C:** 60 minutos após adição de d-tubocurarina; **D:** adição da neostigmina (2,0 μg/ml).

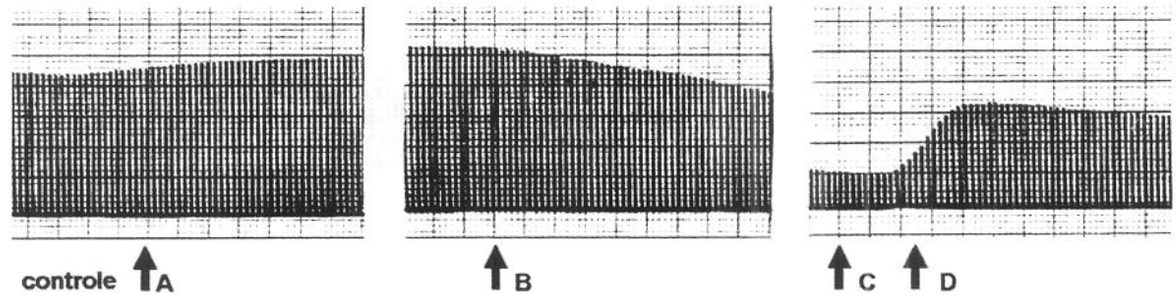


Figura 5. Efeitos da d-tubocurarina (0,3μg/ml) nas respostas musculares a estimulação indireta (freqüência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações NFD previamente expostas a lidocaína (20μg/ml). Efeito da neostigmina. A: adição de lidocaína; B: adição de d-tubocurarina, 30 minutos após exposição à lidocaína; C: 60 minutos após adição de d-tubocurarina; D: adição da neostigmina (2,0 μg/ml).

Na preparação diafragma de rato cronicamente desnervado foram estudadas as respostas a acetilcolina (5μg/ml) antes e após a adição dos anestésicos locais. A procaína e a lidocaína causaram diminuição significativa (p=0,0431) na amplitude da resposta contraturante à acetilcolina, em relação a resposta controle, sendo estas de 52,75% ± 5,66 e 19,35% ± 6,8, respectivamente (Figuras 6 e 7).

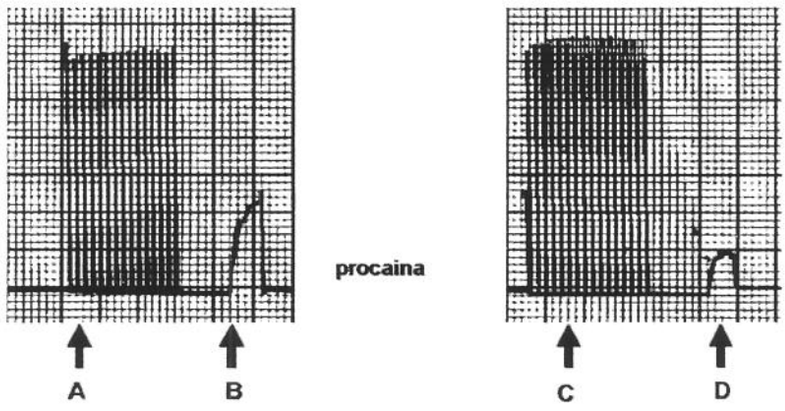


Figura 6. Efeito da procaína (40 μg/ml) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5μg/ml) em preparação diafragma de rato desnervado (n=5), sob estimulação elétrica direta (freqüência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A**: controle; **B**: adição de acetilcolina; **C**: 30 minutos após a adição de procaína, **D**: adição de acetilcolina.

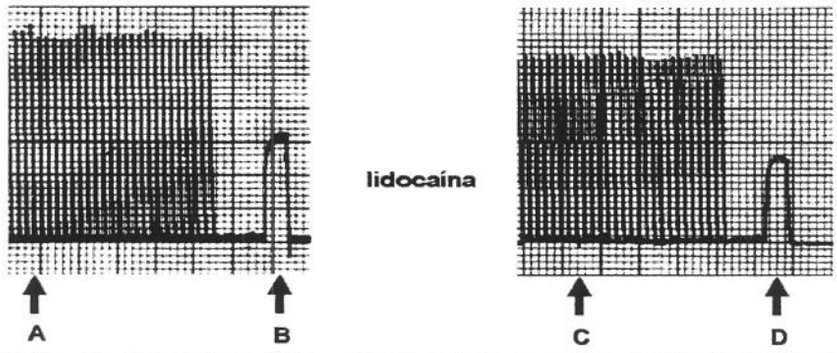


Figura 7. Efeito da lidocaína (20 μg/ml) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5μg/ml) em preparação diafragma de rato desnervado (n=5), sob estimulação elétrica direta (freqüência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A**: controle; **B**: adição de acetilcolina; **C**: 30 minutos após a adição de lidocaína, **D**: adição de acetilcolina.

Os anestésicos locais nas concentrações empregadas não causaram alterações significativas nas medidas do potencial de membrana, demonstrando que nestas concentrações, a procaína e a lidocaína não possuem ação despolarizante sobre a fibra muscular.

O efeito da procaína sobre os potenciais de placa terminal em miniatura caracterizou-se por diminuição progressiva da freqüência e da amplitude destes potenciais até o bloqueio total observado aos 30 minutos da adição da droga (Figura 8). Com a lidocaína inicialmente verificou-se um aumento na freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura, observado 30 minutos após a adição da droga, seguido de bloqueio aos 60 minutos. (Figura 9)

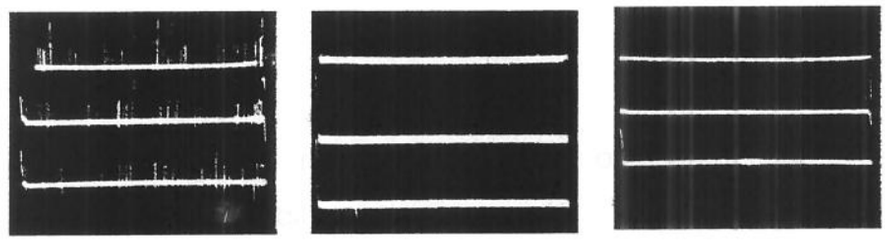


Figura 8 - Efeito da procaína (40μg/ml) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação diafragma de rato. **A**: antes da adição de procaína (controle); **B**: 30 minutos após a adição de procaína; **C**: 60 minutos após a adição da procaína.

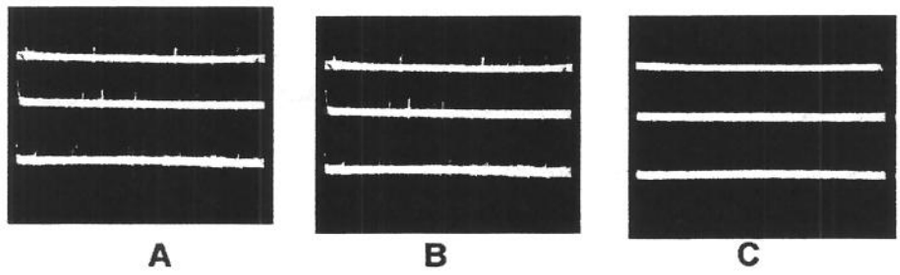


Figura 9 - Efeito da lidocaína (20μg/ml) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação diafragma de rato. A: antes da adição de lidocaína (controle); B: 30 minutos após a adição de lidocaína; C: 60 minutos após a adição da lidocaína.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho, mostram que em preparação nervo frênico-diafragma de rato, a procaína e a lidocaína nas concentrações empregadas e administradas isoladamente não comprometem a transmissão neuromuscular. Nas mesmas condições, a d-tubocurarina na concentração estudada mostrou-se ineficaz, para ocasionar bloqueio neuromuscular. No entanto, em preparação previamente exposta aos anestésicos locais, proporcionou evidente bloqueio neuromuscular.

A potencialização dos bloqueadores neuromusculares pelos anestésicos locais pode ocasionar efeitos desagradáveis nos procedimentos cirúrgicos quando do uso simultâneo dessas drogas em diferentes práticas clínicas.

COBERT (1982) [20] relatou os resultados de alguns autores que não evidenciaram ação direta dos anestésicos locais sobre a placa mioneural, mas admitiam uma possível interação dessas drogas com os bloqueadores neuromusculares adespolarizantes, potencializando o efeito destes na junção neuromuscular. Resultados semelhantes foram relatados por FONTANA e VITAL BRAZIL (1973) [21], que observaram potencialização do bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina, quando do emprego simultâneo da procainamida. Estes achados foram confirmados recentemente por alguns autores, que concluíram ser esta

potencialização atribuída a um menor número de receptores pós-sinápticos disponíveis, ocasionado pela exposição prolongada da junção neuromuscular a procainamida, e não a um efeito competitivo direto entre a procainamida e o neurotransmissor. Pode-se portanto inferir que os anestésicos locais diminuem a margem de segurança da junção neuromuscular facilitando a ligação dos bloqueadores neuromulares no seu local de ação [22].

Outros mecanismos podem estar envolvidos nesta interação: ação pré-sináptica, como diminuição na liberação de acetilcolina, e ação pós-sináptica, como estabilização da membrana pós-juncional, não sendo excluída a interferência com o mecanismo de excitação-contração da fibra muscular [23].

MATSUO et al (1978) [2] descreveram que a potencialização dos agentes bloqueadores neuromusculares pelos anestésicos locais, pode ser evidenciada por um aumento na duração do bloqueio neuromuscular, com apneia e necessidade de assistência ventilatória. Em seus experimentos, a d-tubocurarina (0,34 ± 0,01 μg.ml) em associação com a lidocaína (25μg.ml) produziu 90% de bloqueio neuromuscular. Por esta razão a administração de lidocaína endovenosa para o tratamento de arritmias cardíacas durante procedimentos cirúrgicos deve ser cuidadosa, quando do emprego simultâneo de bloqueadores neuromusculares.

BOWMAN et al(1970) [24] descreveu existir uma teoria relacionada com o modo de ação dos anestésicos locais que se baseia na hipótese de que a acetilcolina está envolvida na condução nervosa, e as moléculas de muitos anestésicos locais por apresentarem semelhança estrutural com a acetilcolina, são capazes de antagonizar sua ação estimulante em vários tecidos. Isso pode sugerir que os anestésicos locais bloqueiam a condução, antagonizando a acão da acetilcolina dentro da membrana.

Os anestésicos locais nas concentrações estudadas não alteraram o potencial de membrana das fibras musculares, demonstrando portanto não possuir ação despolarizante sobre a fibra muscular esquelética.

Embora a procaína e a lidocaína isoladamente não tenham comprometido as respostas musculares a estimulação indireta, os resultados dos estudos eletrofisiológicos evidenciam que estas drogas nas concentrações empregadas,

interferem nos potenciais em miniatura da placa terminal. Observou-se que a procaína causou bloqueio progressivo destes, com diminuição na freqüência e na amplitude, até o seu completo desaparecimento. Ao contrario, a lidocaina inicialmente aumentou a freqüência dos pptm, o que reflete um aumento na liberação do neurotransmissor.

Este efeito já foi observado anteriormente com a procainamida e pode ser atribuído a um efeito inibidor da acetilcolinesterase, com aumento da acetilcolina na fenda sináptica ou a uma certa atividade agonista intrínseca e por isso pode ativar os receptores nos estágios iniciais de sua ação. Na membrana pós-sináptica, os anestésicos locais são capazes de se ligar às áreas especificas dos receptores nicotínicos diferentes das de acetilcolina promovendo a dessensibilização destes receptores [22].

O bloqueio neuromuscular ocasionado pela associação anestésicos locais-bloqueadores neuromusculares foi revertido pela neostigmina, anticolinesterásico amplamente utilizado na clínica para a reversão do bloqueio neuromuscular produzido pelos bloqueadores neuromusculares adespolarizantes como a d-tubocurarina, pancurônio, vecurônio e rocurônio.

A eficácia da neostigmina na reversão do bloqueio foi somente parcial, ao contrário quando se utilizou a 4-aminopiridina que promoveu reversão total do bloqueio neuromuscular, sendo também relatado por outros autores[2].

A 4-aminopiridina, alem do efeito inibidor de dessensibilização de receptores nicotínicos da placa terminal, provoca grande aumento dos quanta de acetilcolina, sendo esse aumento resultante de duas ações distintas na membrana das terminações nervosas: inibição dos canais de potássio, o que produz aumento na duração do potencial de ação, e maior influxo de íons cálcio para as terminações nervosas motoras durante a despolarização da membrana[25-26]. Embora o mecanismo subsináptico pelo qual a 4-aminopiridina aumenta a liberação do transmissor ainda não esteja completamente elucidado, a eficácia da droga como antagonista do bloqueio neuromuscular pré e pós sináptico tem sido evidenciado em testes experimentais [2,25,27]. No entanto seu uso na clínica não é preconizado,

pois atravessa facilmente a barreira hematoencefálica com estimulação do SNC, podendo causar convulsões [28].

CONCLUSÃO

Na concentração estudada os anestésicos locais potencializaram o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina. Não alteraram o potencial de membrana demonstrando que o local de ação é na junção neuromuscular, particularmente na placa motora terminal. Apresentaram efeito pré-sináptico refletido por bloqueio dos potenciais em miniatura da placa terminal. A neostigmina antagonizou de maneira parcial o bloqueio neuromuscular produzido pela associação anestésicos locais – d-tubocurarina. Os resultados obtidos na preparação diafragma de rato cronicamente desnervado reforçam a ação pós-sináptica dos anestésicos locais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Televuo L, Katz RL. The effects of modern intravenous local analgesics on respiration during partial neuromuscular block in man. Anaesthesia. 1970; 25:30-35.
2. Matsuo S, Rao DBS, Chaudry I, Foldes FF. Interaction of muscle relaxants and local anesthetics at the neuromuscular junction. Anesth Analg. 1978; 57:580-587.
3. Hunter JM. New Neuromuscular Blocking Drugs. N Engl J Méd. 1995; 332: 1691-1699.
4. Stoelting RK. Neuromuscular blocking drugs. In: Stoelting RK. Pharmacology & Phisiology in Anesthetic Practice. Philadelphia: Lippincott Williams Wilk, 1999. p182-223.
5. Almeida MCS. Farmacologia dos Bloqueadores Neuromusculares. In: Almeida MCS. Bloqueadores Neuromusculares em Anestesia e Terapia Intensiva. São Paulo: Atheneu, 2003. p 27-54.
6. Pedemeiras S G. Interação de Drogas com relaxantes musculares. Rev Bras Anest. 1988; 38:63-73.

7. 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: 277-282.
8. Harrah MD; Way WL; Katzung BG. The interaction of d-tubocurarine with antiarrhythmic drugs. Anesthesiology. 1970; 33: 406-410.
9. Hirst GDS Wood DR. On the neuromuscular paralysis produced by procaine. Br J Pharmac. 1971; 41:94-04.
10. Straughan DW. The action of procaine of the neuromuscular junction. J. Pharm. Pharmocol. 1971; 41:94-104.
11. Maeno T, Edwards C, Hashimura S. Difference in effects and end-plate potencials between procaine and lidocaine as revealed by voltage-clamp experiments. J. Neurophysiol. 1971; 34:32-46.
12. Steinbach AB. Alteration by xylocaine (lidocaine) and its derivatives of the time course of the end plate potential. J Gen Physiol. 1968;52:144-161.
13. Bruckner J, Thomas KC Jr, Bikhazi GB, Foldes FF. Neuromuscular drug interactions of clinical importance. Anesth Analg. 1980;59:678-682.
14. Carpenter RL, Mulroy MF. Edrophonium antagonize combined lidocaíne-pacuronium and verapamil-pancuronium neuromuscular blockade in cats. Anesthesiology. 1986; 65:506-510.
15. Usubiaga JE, Standaert F. The effects of local anesthetics on motor nerve terminals. J Pharmacol Exp Ther. 1968;159:353-361.
16. Neher E, Steinback JH. Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. J. Physiol. 1978; 277: 153-176.
17. Ruff RL. The kinetics of local anesthetic blockade of end-plate channels. Biophys J. 1982;37:625-631.
18. Bulbring E. Observation on the isolated phyrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. Br J Pharmacol. 1946; 1:38-61.
19. Vital Brazil, O. Ação neuromuscular da peçonha de Micrurus. O Hospital. 1965;68: 183-224.
20. Colbert, CE – farmacodinâmica. São Paulo: Artes Médicas, 1982; 725p.

21. Fontana MD, Vital Brazil O. Sobre o mecanismo da potenciação causada pela quinidina e procainamida sobre o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina. Ciência e Cultura. 1973; 25:482.
22. Martins TD, Fontana MD. Estudo do Mecanismo de Ação da Procainamida sobre a Junção Neuromuscular. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Médicas , Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 2004; 83p.
23. Tardelli, MA – Anestésicos locais. In: SAESP-TSA. Curso de atualização e reciclagem. São Paulo: Atheneu, 1991; p.57-67.
24. Bowman, W.C; Rand, M.J; West,Gb – Anestesicos locales. In: Farmacologia. Barcelona: Editorial JLMS, 1970; p. 625-632.
25. Yeh JZ, Oxford GS, Wu CH et al - Interactions of aminopyridines with potassium channels of squid axon membranes. Biophys J, 1976;16:77-81.
26. 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.
27. Vital Brazil O, Fontana MD, Pavani NJ - . Effect of 4-aminopyridine on the postsynaptic action of polymyxin B. Eur J Pharmacol, 1989;159:47-51.
28. Harvey AL, Marshall IG - The actions of three diaminopyridines on the chick biventer cervicis muscle. Eur J Pharmacol, 1977;44:303-309.

ANEXO 7– TABELAS

Tabela 3- Valores individuais, média e desvio padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico hemidiafragma de rato, causada pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) isoladamente e pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) em preparação previamente exposta a procaína (40μg/mL).

EXPERIMENTOS (n= 5)	**d-tubocurarina**	**d-tubocurarina e procaína**	**p**
1	0	83,4	
2	0	76,0	
3	0	66,6	
4	0	80,0	
5	0	70,0	
X ± DP	0	75,2±6,92	0,0079

Teste de Mann-Whitney

Tabela 4- Valores individuais, média e desvio padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico hemidiafragma de rato, causada pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) isoladamente e pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) em preparação previamente exposta a lidocaina (20μg/mL)

EXPERIMENTOS (n= 5)	**d-tubocurarina**	**d-tubocurarina e lidocaína**	**p**
1	0	64,0	
2	0	64,0	
3	0	58,0	
4	0	60,0	
5	0	70,0	
X ± DP	0	63,2 ± 4,60	0,0079

Teste de Mann-Whitney

Tabela 5- Valores individuais, média e desvio padrão da amplitude das respostas musculares (%) a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico hemidiafragma de rato, após a adição da neostigmina (2μg/mL) para reversão do bloqueio causado pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) em preparação previamente exposta a procaína (40μg/mL).

EXPERIMENTOS (n= 5)	**Amplitude das respostas-controle (%)**	**Amplitude das respostas após neostigmina (%)**	**p**
1	100	66,6	
2	100	80,0	
3	100	47,0	
4	100	66,6	
5	100	66,6	
X ± DP	100	65,36 ± 11,79	0,0431

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Tabela 6- Valores individuais, média e desvio padrão da amplitude das respostas musculares (%) a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico hemidiafragma de rato, após a adição da neostigmina (2μg/mL) para reversão do bloqueio causado pela d-tubocurarina (0,3μg/mL) em preparação previamente exposta a lidocaina (20μg/mL).

EXPERIMENTOS (n= 5)	**Amplitude das respostas-controle (%)**	**Amplitude das respostas (%)**	**p**
1	100	57,0	
2	100	80,0	
3	100	65,5	
4	100	57,0	
5	100	65,5	
X ± DP	100	65,0 ± 9,40	0,0431

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Tabela 7- Valores individuais, média e desvio padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico hemidiafragma de rato, causada pelo rocurônio (4 μg/mL) em preparação previamente exposta a procaína (40μg/mL).

EXPERIMENTOS (n= 5)	**Rocurônio**	**Procaína e Rocurônio**	**p**
1	44,0	77.78	
2	70,0	71.42	
3	66,0	77.78	
4	63,0	72.00	
5	46,0	78.58	
X ± DP	57,8±11,9	75.51±3,49	0,0079

Teste de Mann-Whitney

Tabela 8- Valores individuais, média e desvio padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico hemidiafragma de rato, causada pelo rocurônio (4 μg/mL) em preparação previamente exposta a lidocaína (20 μg/mL).

EXPERIMENTOS (n= 5)	**Rocurônio (%)**	**Lidocaína e Rocurônio**	**p**
1	44,0	82.75	
2	70,0	83.33	
3	66,0	81.48	
4	63,0	85.71	
5	46,0	80.76	
X ± DP	57,8±11,9	82.80±1.91	0,0079

Teste de Mann-Whitney

Tabela 9- Valores individuais, média e desvio padrão da amplitude das respostas musculares (%) a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico hemidiafragma de rato, após a adição da neostigmina (2μg/mL) para reversão do bloqueio causado pelo rocunônio (4μg/mL) em preparação previamente exposta a procaína (40μg/mL).

EXPERIMENTOS (n=5)	**Amplitude das respostas-controle (%)**	**Amplitude das respostas após neostigmina (%)**	**p**
1	100	33,3	
2	100	40,0	
3	100	30,0	
4	100	30,0	
5	100	33,3	
X ± DP	100	33,32±4,08	0,0431

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Tabela 10- Valores individuais, média e desvio padrão da amplitude das respostas musculares (%) a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico hemidiafragma de rato, após a adição da neostigmina (2μg/mL) para reversão do bloqueio causado pelo rocunônio (4μg/mL) em preparação previamente exposta a lidocaína (20μg/mL).

EXPERIMENTOS (n=5)	**Amplitude das respostas-controle (%)**	**Amplitude das respostas após neostigmina (%)**	**p**
1	100	50,0	
2	100	40,0	
3	100	50,0	
4	100	40,0	
5	100	43,3	
X ± DP	100	44,66±5,05	0,0431

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Tabela 11- Valores individuais, média, desvio padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta muscular a acetilcolina (5μg/mL), em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado, antes e após a adição de procaína (40μg/mL).

EXPERIMENTOS (n= 5)	**Antes da Procaína**	**Após Procaina**	**% de redução**	**p**
1	100	41.66	58.34	
2	100	50.0	50.0	
3	100	46.15	53.85	
4	100	55.55	44.45	
5	100	42.85	57.15	
X ± DP	100	47.24±5.06	52.75±5.66	0,0431

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Tabela 12- Valores individuais, média, desvio padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta muscular a acetilcolina (5μg/mL), em preparação hemidiafragma de rato cronicamente desnervado, antes e após a adição de lidocaína (20μg/mL)

EXPERIMENTOS (n= 5)	Antes da Lidocaína	Após Lidocaína	% de redução	p
1	100	80,0	20,0	
2	100	70,0	30,0	
3	100	87,5	12,5	
4	100	85,71	14,29	
5	100	80	20,0	
X ± DP	100	80.64±6.11	19,35±6,83	0,0431

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Tabela 13- Valores individuais, média, desvio-padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta muscular a acetilcolina (5μg/mL), em preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e após a adição de procaína (40μg/mL)

EXPERIMENTOS (n= 5)	Antes da Adição da Procaina	Após Adição da Procaina	% de redução	p
1	100	50.0	50.0	
2	100	55.55	44.45	
3	100	50.0	50.0	
4	100	42.85	57.15	
5	100	50.0	50.0	
X ± DP	100	48.68±2.92	50.32±4.51	0,0431

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

Tabela 14- Valores individuais, média, desvio padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta muscular a acetilcolina (5μg/mL), em preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e após a adição de lidocaína (20μg/mL)

EXPERIMENTOS (n=5)	Antes da Lidocaína	Após a Lidocaína	% de redução	p
1	100	90	10	
2	100	71,42	28,58	
3	100	90	10	
4	100	71,42	28,58	
5	100	62,5	37,5	
X ± DP	100	77.07±11.05	22,93±12,35	0,0431

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas.