

SILMARA RODRIGUES DE SOUSA

**Influência da Nifedipina no Bloqueio
Neuromuscular Produzido por Diferentes
Bloqueadores Neuromusculares. Estudo
Experimental.**

CAMPINAS

2005

SILMARA RODRIGUES DE SOUSA

**Influência da Nifedipina no Bloqueio
Neuromuscular Produzido por Diferentes
Bloqueadores Neuromusculares. Estudo
Experimental.**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de Mestre
em Farmacologia.*

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

CAMPINAS

2005

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

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

So89i Sousa, Silmara Rodrigues de
Influência da nifedipina no bloqueio neuromuscular produzido por diferentes bloqueadores neuromusculares. Estudo Experimental. / Silmara Rodrigues de Sousa. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

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

1. Atracúrio. 2. Agentes não Despolarizantes. 3. Interações de Medicamentos. 4. Nifedipina. 5. Cisatracúrio. 6. Cálcio - Antagonistas. I. Braga, Angélica de Fátima de Assunção. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Membros:

Profa. Dra. Norma Sueli Pinheiro Módolo

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Prof. Dr. Édson Antunes

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

Data: 15 / 12 /2005

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido mestre

Professor Dr. Marcos Dias Fontana *(in memória)*.

Alguém que foi muito mais do que professor, um grande amigo que acreditou em mim quando outros não acreditaram, estendeu muitas vezes suas mãos e até mesmo ofereceu o seu ombro - alguém que fez a diferença.

Como não lembrar das inúmeras vezes em que chegava ao laboratório ansiosa, triste ou preocupada; ficava em meu canto tentando estudar ou fazer experimentos, acelerava o tempo, cabisbaixa, pois se para ele olhasse certamente perceberia. Ele enxergava além do que “parecia” e dizia, não tenha pressa. Então, sentava ao meu lado e perguntava o que estava acontecendo e como um grande amigo aconselhava e me fazia ver valores que eu não conseguia enxergar.

Realmente devo muito a ele. Lembro-me também claramente quando por três semanas seguintes me fez apresentar em público diferentes trabalhos, uma vez que eu sempre dizia ter “medo” de fazê-lo. Quando isso ocorreu passou em minha cabeça, que poderia ser um castigo. Mas somente na terceira semana, em que tinha evoluído bastante, percebi o quanto ele se preocupava e usava métodos que realmente funcionavam para me ensinar. Ele me disse que eu não tinha o direito de dizer que não ia apresentar por medo, que isso era coisa de pessoa despreparada. Hoje sempre que tenho que fazer

uma apresentação e alguém me pergunta se estou nervosa penso nele, penso que posso me preocupar, mas não tenho o direito de ter medo.

Os seus ensinamentos, a sua firmeza e por outro lado, a solidariedade e compreensão que esse professor dedicou a mim, mudaram a minha vida e possibilitaram a realização desse trabalho, que é para mim uma grande vitória.

Obrigada meu orientador por ter sido mais do que um avaliador, por ter sido realmente um educador.

Silmara Rodrigues de Sousa

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Marcos Dias Fontana pela oportunidade que me proporcionou e pela orientação para a vida.

À minha orientadora Dra. Angélica Braga, pela imensa dedicação desde o início desse trabalho como co-orientadora e posteriormente como orientadora, sempre muito cuidadosa possibilitou a realização desse sonho. Muito obrigada pela orientação e ensinamentos de vida.

À minha família que sempre me apoiou, em particular a minha mãezinha que muitas vezes acordava cedo para preparar meu café da manhã e o almoço para levar para Unicamp, tempos difíceis... Obrigada mamãe.

Aos professores Dr. Edson Antunes, Dra. Albetiza Lôbo e Dra. Rosa Inês C. Pereira, por terem participado da banca de qualificação e pelas diversas sugestões.

Aos professores Dra. Norma S. P. Módulo e Dr. Edson Antunes por aceitar participar da banca de defesa.

À Dra. Arneth Rodrigues Ribeiro pelo grande auxílio com o inglês e à Sirley Siani Moraes pela valiosa ajuda na análise estatística.

Ao Dr. Stephen Hyslop pela oportunidade do estágio e os ensinamentos sobre pesquisa.

Aos técnicos Toninho e Gildo pela imensa ajuda nas difíceis técnicas do laboratório, sempre nos socorrendo quando solicitávamos.

Aos funcionários Zé Ilton, Marcos e Sr. Miguel (do biotério), Adilson, Guina, sempre muito prestativos.

A professora Dra. Léa Rodrigues Simioni e demais professores do Departamento de Farmacologia – FCM – UNICAMP, que de alguma forma participaram e contribuíram para minha formação e realização desse trabalho.

Aos funcionários da secretaria Wanderley, Francileide, Elaine e ao pessoal da limpeza, sempre muito solícitos.

Às amigas Samanta, Caroline, Lia, Yolanda, Thalita, Pâmela e Martinha e a todos amigos do departamento pelo companheirismo e pelos ensinamentos.

Agradeço também ao Otavio M. Machado e a todos amigos que me apoiaram.

À todos obrigada!

INDICE

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xv
RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xix
1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Geral	34
2.2 Específicos.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Animais.....	36
3.2 Fármacos e Concentrações Utilizadas.....	36
3.3 Métodos Utilizados.....	37
3.3.1 Preparação Nervo Frênico-Hemidiafragma de Rato.....	37
3.3.1.1 Concentração de Nifedipina Utilizada nos Experimentos.....	38
3.3.1.2 Influência da Nifedipina (4µg/ml) sobre a Transmissão Neuromuscular.....	38
3.3.1.3 Influência da nifedipina (4µg/ml) no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina (0,5µg/ml), atracúrio (20µg/ml) e cisatracúrio (3 µg/ml).....	39
3.3.2 Influência da nifedipina sobre a ação contraturante da acetilcolina Preparação Hemidiafragma de Rato Cronicamente Desnervado.....	39
3.3.3 Influência da nifedipina sobre a ação contraturante da acetilcolina Preparação Músculo <i>Biventer Cervicis</i> de Pintainho.....	41
3.3.4 Estudos Eletrofisiológicos.....	42

3.3.4.1 Montagem da Preparação e Confeção dos Microeletrodos (Me).....	42
3.3.4.2 Descrição do Circuito (Figura 6).....	43
3.3.4.3 Medida da Resistência do Microeletrodo.....	44
3.3.4.4 Influência da nifedipina nos potenciais de membrana (PM).....	45
3.3.4.5 Influência da nifedipina nos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM).....	45
3.3.5 Análise Estatística.....	46
4. RESULTADOS.....	47
4.1 Efeito da nifedipina e dos bloqueadores neuromusculares d-tubocurarina, atracúrio e cisatracúrio, nas respostas musculares em preparação nervo frênico-diafragma de rato.....	48
4.2 Influência da nifedipina no bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio, cisatracúrio e d-tubocurarina, em preparação nervo frênico – hemidiafragma de rato.....	50
4.3 Efeito da nifedipina na resposta contraturante a acetilcolina.....	53
4.3.1 Preparação biventer cervicis de pintainho.....	53
4.3.2 Preparação Hemidiafragma Rato Cronicamente Desnervado.....	54
4.4. Estudos eletrofisiológicos.....	56
4.4.1 Influência da nifedipina sobre os potenciais de membrana das fibras musculares em diafragma de rato.....	56
4.4.2 Influência da Nifedipina sobre os Potenciais de Placa Terminal em Miniatura (PPTM).....	57
5. DISCUSSÃO.....	59
6. CONCLUSÕES.....	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
8. ANEXOS.....	85
8.1 Anexo 1. Comissão de Ética na Experimentação Animal - IB - UNICAMP – Protocolo nº 898-2.....	86
8.2 Anexo 2. COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.....	87

8.3 Anexo 3. Processo Editorial RBA-346/05.....	89
8.4 Anexo 4. Artigo Aceito para Publicação.....	90
8.5 Anexo 5.Tabelas.....	102

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ach: Acetilcolina

d-Tc: d-Tubocurarina

g: grama

Kg: Kilograma

PPTM: potencial de placa terminal em miniatura

min.: minuto

mg: miligrama

µg: micrograma

cm: centimetro

mV: milivolts

ml: mililitros

mM: milimolar

M: molar

MΩ: miliohms

Hz: Hertz

°C: graus Célsius

ms: milisegundos

n: número de experimentos

DP: desvio padrão

DC₂₅: duração clínica

DE₉₅: dose efetiva para bloqueio de 95% da resposta ao adutor do polegar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da d-tubocurarina.....	24
Figura 2. Fórmula estrutural do atracúrio.....	26
Figura 3. Fórmula estrutural do cisatracúrio.....	28
Figura 4. Fórmula estrutural da nifedipina.....	32
Figura 5. Esquema da preparação Nervo Frênico – Diafragma de Rato.....	38
Figura 6. Microeletrodo e montagem de aparelhagem para os experimentos eletrofisiológicos.....	43
Figura 7. Efeito da nifedipina (4µg/ml) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico - diafragma de rato (n=5).....	48
Figura 8. Efeito do atracúrio (20µg/ml) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico - diafragma de rato (n=5).....	49
Figura 9. Efeito do cisatracúrio (3µg/ml) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico - diafragma de rato (n=5).....	49
Figura 10. Efeito da d-tubocurarina (0,5µg/ml) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico - diafragma de rato (n=5).....	50
Figura 11. Efeito da associação nifedipina (4µg/ml) + d-tubocurarina (0,5µg/ml) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico - diafragma de rato (n=5).....	51
Figura 12. Efeito da associação nifedipina (4µg/ml) + atracúrio (20µg/ml) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico - diafragma de rato (n=5).....	51
Figura 13. Efeito da associação nifedipina (4µg/ml) + cisatracúrio (3µg/ml) nas respostas	

musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico - diafragma de rato (n=5).....52

Figura 14. Registro miográfico do efeito da nifedipina (4µg/ml) sobre a curva de acetilcolina (20µg/ml) na preparação *biventer cervicis* de pintainho(n=4), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração de 0,2ms) **A**- efeito da Ach antes da nifedipina. **B**- efeito da Ach 30 minutos após nifedipina.....53

Figura 15. Registro miográfico do efeito da nifedipina (4µg/ml) sobre a curva de acetilcolina (20µg/ml) na preparação diafragma de rato cronicamente desnervado (n=4), sob estimulação elétrica direta, (frequência 0,1Hz e duração de 0,2ms). **A**- efeito da Ach antes da nifedipina. **B**- efeito da Ach 30 minutos após nifedipina.....55

Figura 16. Efeitos da nifedipina (4 µg/ml) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura, em diafragma de rato (n= 3). **A**- controle; **B**- 30 minutos após nifedipina; **C**- 60 minutos após nifedipina.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão de potencial de membrana (mV), obtidos em diafragma de rato (n=3) exposto a nifedipina (4µg/ml).....	57
Tabela 2. Valores individuais, médias e desvios padrão dos percentuais de redução (%) das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta após 45 minutos da adição de d-tubocurarina e da associação d-tubocurarina – nifedipina.....	102
Tabela 3. Valores individuais, médias e desvios padrão dos percentuais de redução (%) das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta após 45 minutos da adição de atracúrio e da associação atracúrio – nifedipina.....	103
Tabela 4. Valores individuais, médias e desvios padrão dos percentuais de redução (%) das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta após 45 minutos da adição de cisatracúrio e da associação cisatracúrio – nifedipina.....	103
Tabela 5. Valores individuais, médias e desvios-padrão da altura (cm) das respostas a acetilcolina (20µg/ml), em preparação Biventer cervicis de Pintainho antes e após 30 minutos da adição da nifedipina (4µg/ml).....	103
Tabela 6. Valores individuais, médias e desvios-padrão da altura (cm) das respostas a acetilcolina (20µg/ml), em preparação diafragma de rato cronicamente desnervado antes e após 30 minutos da adição da nifedipina (4µg/ml).....	104

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Amplitude (cm) da contratura provocada pela acetilcolina (20µg/ml) na preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a nifedipina (4µg/ml).....54

Gráfico 2. Amplitude (cm) da contratura provocada pela acetilcolina (20µg/ml) na preparação diafragma de rato cronicamente desnervado, antes e 30 minutos após a nifedipina (4µg/ml).....55

Gráfico 3. Efeitos da nifedipina (4 µg/ml) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares do diafragma de rato. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três experimentos.....57

Resumo

RESUMO

Embora inúmeros estudos tenham sido realizados para investigar os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio nas respostas musculares e sua interação com bloqueadores neuromusculares, os resultados ainda são controversos. Neste estudo através de experimentos específicos na junção neuromuscular foram avaliados os seguintes parâmetros: o efeito da nifedipina na transmissão neuromuscular; nos potenciais de membrana e potenciais de placa terminal em miniatura (pptms); a sua influência no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina, atracúrio e cisatracúrio. Avaliou-se também em preparações diafragma de rato cronicamente desnervado e *biventer cervicis* de pintainho os efeitos da nifedipina na ação contraturante da acetilcolina. Os resultados foram expressos em médias e desvios padrão e analisados através dos testes t de *Student* pareado e não pareado, adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Nas preparações nervo frênico - diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta, a nifedipina na concentração empregada, não alterou a amplitude das respostas musculares, mas potencializou os efeitos do atracúrio e do cisatracúrio, não influenciando no bloqueio neuromuscular produzido pela d-Tc. A nifedipina não causou alteração significativa nos potenciais de membrana, não demonstrando ação despolarizante na fibra muscular; em relação aos pptms a nifedipina promoveu um aumento inicial na frequência, provavelmente por um aumento na liberação do neurotransmissor, seguida de bloqueio. Nas preparações *biventer cervicis* de pintainho e diafragma de rato cronicamente desnervado, a nifedipina não alterou a resposta contraturante da acetilcolina, evidenciando ausência

de efeito pós-sináptico. Os resultados obtidos demonstram um sinergismo entre as drogas devido principalmente a um efeito pré-sináptico.

S u m m a r y

SUMMARY

Although a number of studies have been conducted to investigate the effects of calcium channel blockers on muscle response and their interaction with neuromuscular blockers, the results are still controversial. In this study, using specific experiments on the neuromuscular junction the following parameters were assessed: the effect of nifedipine on neuromuscular transmission; on membrane potentials and miniature end-plate potentials (meps); its influence on neuromuscular blockade produced by d-tubocurarine, atracurium and cisatracurium. It was also evaluated in chronically denervated rat diaphragm preparation and chick biventer cervicis preparation the effects of nifedipine on acetylcholine contracture. The results were expressed in average and standard deviation and analyzed through the paired and non-paired Student's t-Test, adopting a level of significance of 5% ($p < 0.05$). In rat phrenic nerve diaphragm preparations under indirect electric stimulation, nifedipine did not change the amplitude of the muscle response in the concentration used but potentiated the effects of atracurium and cisatracurium, not influencing the neuromuscular block produced by d-Tc. Nifedipine caused no significant alteration in membrane potentials, not demonstrating depolarizing action in the muscle fiber; nifedipine promoted an initial increase in the frequency of meps probably due to an increase in neurotransmitter release, followed by blockade. In chick biventer cervicis preparations and chronically denervated rat diaphragm, nifedipine did not alter the response to acetylcholine contracture evidencing a lack of postjunctional effect. The results obtained demonstrate a synergism among the drugs mainly due to a prejunctional effect.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Poucas foram as drogas que despertaram tanto interesse em diversas áreas da medicina quanto o curare, seus derivados semi-sintéticos e as substâncias sintéticas que atuam de modo similar, ou seja, no nível dos receptores nicotínicos situados na junção neuromuscular. Estas drogas têm sido denominadas curarizantes, bloqueadores neuromusculares e relaxantes musculares.

Bloqueador neuromuscular designa não somente as substâncias que atuam nos receptores nicotínicos, impedindo a ação da acetilcolina, como aquelas que interferem com a sua síntese ou liberação e conseqüentemente com a transmissão do impulso nervoso (WAUD, 1984; STOELTING e HILLIER, 2006). A denominação relaxante muscular, comumente empregada, é imprecisa porque engloba não somente as substâncias que atuam na junção neuromuscular como as que promovem relaxamento muscular esquelético atuando no sistema nervoso central (BOURILLET e CHEYMOL, 1966).

Os bloqueadores neuromusculares (BNM), 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 à medida que aparecem novas moléculas, que progressivamente têm se mostrado mais seguras principalmente em pacientes de maior risco cirúrgico. Apresentam em sua estrutura um ou mais grupos de amônio quaternário, carregados positivamente, que se ligam às 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 (WAUD, 1984; 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 e cols, em 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 utilizou o Intocostin, em paciente submetido à anestesia geral com ciclopropano (DUARTE, 2000).

Os bloqueadores neuromusculares tem sido classificados de modo simplista de acordo com seu mecanismo de ação, em despolarizantes e não despolarizantes ou competitivos. Mais recentemente, devido à diversidade das novas moléculas que têm sido desenvolvidas, foram também agrupados quanto as suas características químicas (HUNTER, 1995; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006). Desde a introdução da d-tubocurarina, na década de 40, e até a década de 80, no século XX, muitas moléculas novas foram pesquisadas surgindo uma série de bloqueadores neuromusculares, do tipo adespolarizante, sintéticos, com grande potencialidade para o uso clínico, resultantes de estudos que se concentram em duas grandes famílias: os benzilisoquinoleínicos e os aminoesteróides. No grupo dos benzilisoquinoleínicos se agrupa a d-tubocurarina, a metocurina, o alcurônio, o atracúrio, o cisatracúrio e o mivacúrio (HUNTER, 1995; FISHER, 1999; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006). A descoberta de bloqueadores neuromusculares como o atracúrio e o

cisatracúrio tiveram importante impacto e ofereceu novas perspectivas quanto à opção de BNM de duração intermediária.

A d-tubocurarina (**Figura 1**) constitui o protótipo dos benzilisoquinoleínicos, com interesse histórico e uso em pesquisas experimentais. É um bloqueador com potência relativamente baixa ($DE_{95} = 0,5\text{mg.kg}^{-1}$), longa duração de ação e muitos efeitos colaterais, decorrentes da ação bloqueadora ganglionar e da liberação de histamina. Há pouco ou nenhum metabolismo, sendo o rim a principal via de eliminação e a participação hepática de pequena importância (BELMONT et al, 1993).

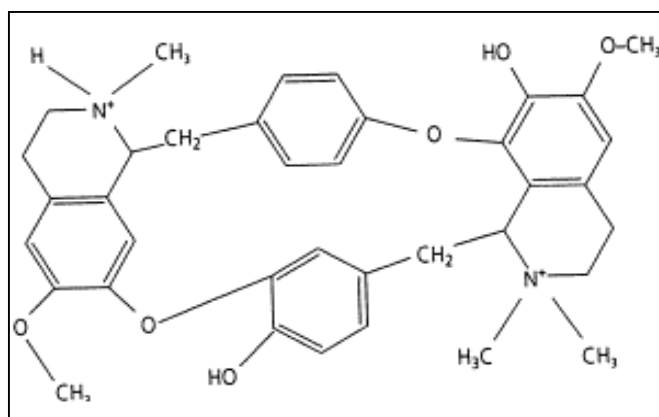


Figura 1. Fórmula estrutural da d-tubocurarina

O atracúrio, composto biquaternário de amônio (**Figura 2**), consiste de uma mistura de 10 isômeros geométricos, com diferentes “clearance” e meias vidas de eliminação. Tem duração de ação e meia vida de eliminação classificadas como intermediárias (TSUI et al, 1987; FISHER, 1999; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006). De efeito altamente seletivo quando usado em doses suficientes para causar bloqueio neuromuscular é desprovido de efeitos cardiovasculares diretos. Na

dependência da dose administrada ($> 2 \times DE_{95}$), pode desencadear liberação de histamina com conseqüente hipotensão arterial e taquicardia (MILLER et al, 1984; MILLER e VON EHRENBURG, 1994; HUNTER, 1995; FISHER, 1999; STOELTING e HILLIER, 2006). A rápida recuperação, ausência de efeitos cumulativos, mesmo quando administrado em infusão contínua, e de efeitos cardiocirculatórios em doses clínicas, associadas à independência do rim e do fígado para sua metabolização e eliminação, tornam o atracúrio uma droga útil em pacientes graves ou de alto risco (GRIFFITH et al, 1986; HUNTER, 1995; STOELTING e HILLIER, 2006).

Com $DE_{95} = 0,2 \text{mg.kg}^{-1}$, é mais potente do que a d-tubocurarina (2,5 vezes) e cerca de 4 a 5 vezes menos potente que o cisatracúrio. O bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio instala-se lentamente, sendo o tempo de latência de 5 a 6 minutos após o emprego de DE_{95} ($0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$), que pode ser encurtado com doses maiores (BASTA et al, 1982; MIRAKHUR et al, 1985; BEVAN, 1994). A duração clínica (DC_{25}) após o uso de $2DE_{95}$ de atracúrio é de 30 a 40 minutos, sendo prolongada quando do aumento da dose. Após o uso de doses repetidas para a manutenção do bloqueio neuromuscular não se observa alteração na curva de recuperação, demonstrando que o atracúrio não é cumulativo, provavelmente devido a sua maneira particular de decomposição e metabolismo. A duração de ação intermediária, associada à ausência ou mínimo efeito cumulativo, possibilitam o seu emprego em infusão contínua (BASTA et al, 1982; ALI et al, 1983; STOELTING e HILLIER, 2006). Devido à estrutura química particular e diferente da dos demais bloqueadores neuromusculares, sofre degradação espontânea no plasma (Degradação de Hofmann), em pH fisiológico e a temperatura normal, processo facilitado por pH alcalino, que dispensa substrato

biológico. Outro processo responsável pelo metabolismo do atracúrio é a hidrólise éster enzimática, facilitada por pH ácido e independente da colinesterase plasmática (HUGHES e CHAPPLE, 1981; BASTA et al, 1982; STOELTING e HILLIER, 2006).

Os principais metabólitos resultantes da Degradação de Hofmann são a laudanosina, amina terciária, e o monoacrilato, composto monoquartenário do amônio e da hidrólise éster resultam, compostos monoquartenários do amônio, produtos desprovidos de efeito bloqueador neuromuscular (BASTA et al, 1982; CHAPPLE e CLARK, 1983; STOELTING e HILLIER, 2006).

Apresenta ampla margem de segurança autonômica, sendo desprovido de efeitos cardiovasculares quando empregado em doses clínicas. Em doses maiores que 2DE₉₅, estes efeitos particularmente taquicardia e hipotensão arterial, associados às manifestações cutâneas, tornam-se evidentes. Devem-se principalmente a liberação de histamina e podem ser prevenidos pela administração lenta ou pelo uso prévio de agentes anti-histaminicos (HUGHES e CHAPPLE, 1981; BASTA et al, 1982; STOELTING e HILLIER, 2006).

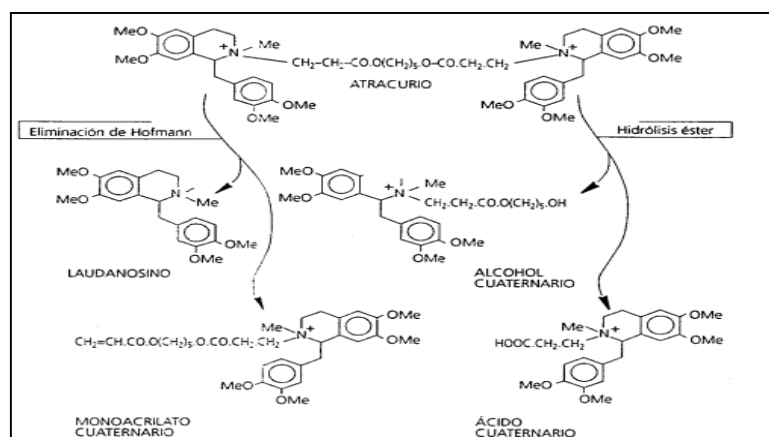


Figura 2. Fórmula estrutural do atracúrio

O cisatracúrio (**Figura 03**) é um dos 10 isômeros do atracúrio, o 1 R Cis – 1 R' Cis, representando aproximadamente 15% da mistura da droga de origem (BELMONT et al, 1995; LIEN et al, 1995; STOELTING e HILLIER, 2006). Foi desenvolvido na tentativa de obter-se um bloqueador neuromuscular com menor tempo de latência e menor incidência de efeitos colaterais, do que o observado com outros bloqueadores neuromusculares (HUNTER, 1995; HUNTER et al, 1995; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006).

Dotado de potente propriedade bloqueadora neuromuscular, o cisatracúrio é cerca de 3 a 4 vezes mais potente que o atracúrio ($DE_{95} = 0,05\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), mas o início, a duração de ação e o tempo de recuperação são similares aos do atracúrio, assim como ausência de efeitos cumulativos, o que permite seu uso em infusão contínua (BELMONT et al, 1995; LIEN et al, 1995; MERETOJA et al, 1995; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006). Trabalhos realizados em animais mostraram que somente as doses de cisatracúrio muitas vezes maiores do que a sua DE_{95} , produzem efeitos mínimos sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca em virtude de sua desprezível ação liberadora de histamina (BELMONT et al, 1993; WASTILA et al, 1996; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006). O bloqueio neuromuscular produzido por 1 DE_{95} do cisatracúrio instala-se em cerca de 7 minutos, sendo mais lento do que o produzido pelo atracúrio, mas também pode ser encurtado com doses maiores. A duração clínica após o emprego de 2 DE_{95} de cisatracúrio é de aproximadamente 45 minutos, similar a relatada para doses equipotentes do atracúrio, sendo prolongada com o aumento da dose (BASTA et al, 1982; BASTA et al, 1988; BELMONT et al, 1995; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006).

Sendo um dos isômeros do atracúrio, o cisatracúrio, provavelmente sofre os mesmos processos de metabolização. É hidrolisado por esterases plasmáticas inespecíficas em intensidade significativa menor do que o atracúrio e é menos sensível à degradação de Hoffmann, o que pode ser constatado pelas baixas concentrações plasmáticas de laudanosina, cerca de 5 vezes menores do que as observadas após o emprego de doses equipotentes de atracúrio (EASTWOOD et al, 1995; SAVARESE e WASTILA, 1995; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006).

Suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, como maior potência, duração de ação intermediária, padrão de recuperação constante e ausência de efeitos cumulativos, antagonizável pelos anticolinesterásicos, assim como a ausência de efeitos autonômicos, cardiovasculares e de mínimo potencial para liberar histamina, confirmam que o cisatracúrio é um aprimoramento do atracúrio. Representa, portanto uma alternativa positiva em anestesia, especialmente quando as alterações cardiovasculares devem ser evitadas, mas as variações de suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, originárias de situações clínicas especiais ainda necessitam de maiores investigações (WASTILA et al, 1996).

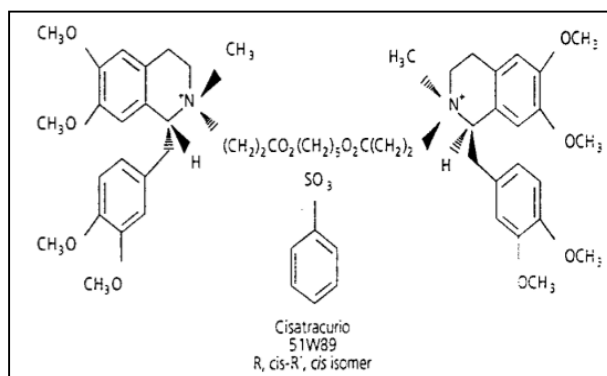


Figura 3. Fórmula estrutural do cisatracúrio

São vários os fármacos utilizados no pré, no per ou no pós-operatório, capazes de interferir na transmissão neuromuscular. As diferentes técnicas anestésicas quase sempre incluem a utilização de bloqueadores neuromusculares, possibilitando efeitos interativos desses com diferentes drogas de emprego clínico. Muitas drogas quando usadas isoladamente e em doses clínicas podem ser isentas de efeitos sobre a função neuromuscular, no entanto em doses elevadas ou o seu emprego simultâneo com bloqueadores neuromusculares, podem levar a alteração da transmissão neuromuscular, potencializar ou antagonizar os efeitos destes agentes (BIKHAZI et al, 1988; SEKERCI e TULUNAY, 1996; ARANÓ et al, 2000).

As interações fármaco *versus* fármaco são apenas um dos múltiplos fatores envolvidos no binômio dose-resposta, seja o fármaco administrado, hipnótico, analgésico ou bloqueador neuromuscular. A interação com os bloqueadores neuromusculares, pode alterar a farmacocinética bem como a farmacodinâmica, além de atuar em diversos locais através de diferentes mecanismos: depressão do impulso no sistema nervoso central; bloqueio da condução nervosa; ação pré-sináptica com diminuição na liberação de acetilcolina pelo terminal nervoso; ação pós-sináptica, com redução da sensibilidade da membrana pós-sináptica a acetilcolina; bloqueio no mecanismo contrátil do músculo; e outros mecanismos que de alguma maneira prejudicam o fluxo de íons pelos canais iônicos, dificultando a despolarização da membrana pós-sináptica. Esse último mecanismo pode manifestar-se através da dessensibilização do receptor de acetilcolina, bloqueio direto de canais iônicos e diminuição na excitabilidade da membrana muscular (MARTINS e MARTINS, 1997).

Na prática clínica as interações mais importantes, por sua freqüência, e repercussões clínicas são resultantes do uso simultâneo de bloqueadores neuromusculares, com agentes voláteis, anestésicos locais, antibióticos, magnésio, lítio, anticonvulsivantes, e fármacos com ação no sistema cardiovascular (BIKHAZI et al, 1988; SEKERCI e TULUNAY, 1996; MARTINS e MARTINS, 1997; ARANÓ et al, 2000). Estas interações têm sido amplamente estudadas e embora algumas tenham sido confirmadas, não se conhece exatamente o mecanismo de ação. Outras permanecem teoricamente possíveis, mas descritas na literatura como casos isolados.

Entre as drogas com ação no sistema cardiovascular, os bloqueadores de canais de cálcio, constituem um grupo de medicamentos amplamente utilizados em pacientes com angina pectoris, cardiomiopatia, arritmias supraventriculares, e hipertensão arterial. Muitos destes pacientes em algum momento da vida podem necessitar de intervenção cirúrgica e encontram-se em uso prolongado destes medicamentos.

Vários estudos investigaram os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio nas respostas musculares, entretanto os resultados são conflitantes. Em alguns, os bloqueadores de canais de cálcio causaram bloqueio neuromuscular; em outros resultaram em contratura muscular ou mesmo nenhum efeito foi observado no músculo esquelético (DURANT et al, 1984; BIKHAZI et al, 1985; BIKHAZI et al, 1988; SEKERCI e TULUNAY, 1996). Estes resultados controversos podem dever-se ao emprego de diferentes metodologias empregadas nos trabalhos.

Estudos realizados em camundongos, avaliando a interação da nifedipina, do diltiazem e do verapamil com a succinilcolina e com a d-tubocurarina, demonstraram

que estas drogas afetam alostericamente os receptores pós-sinápticos da acetilcolina, dessensibilizando-os e assim interagindo sinergicamente com os bloqueadores neuromusculares (CHANG et al, 1990). Ao contrário, outros autores estudaram em humanos, os efeitos da nifedipina, administrada cronicamente, sobre o início e a duração do bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e pelo vecurônio, e não observaram interação significativa entre estes agentes (BELL et al, 1989). Em outros trabalhos, a administração da nifedipina de forma aguda no intra-operatório, para tratamento de hipertensão arterial, resultou em aumento na duração do bloqueio produzido pelo atracúrio e vecurônio (JELEN-ESSELBORN e BLOBNER, 1990).

Os bloqueadores de canais de cálcio, além de interferirem com o influxo desse íon através da membrana do terminal nervoso, apresentam alta atividade anestésica local, provavelmente relacionada com ações pré e pós-juncionais (REVES et al, 1982). É pouco provável que em doses terapêuticas os bloqueadores de Ca^{++} possam determinar bloqueio neuromuscular, mas quando a margem de segurança da transmissão neuromuscular está comprometida pelo uso de BNM ou por patologias neuromusculares, pode haver exacerbação da paralisia muscular (ZALMAN et al, 1983).

Entre os bloqueadores de canais de Ca^{++} , comumente utilizados encontram-se o verapamil, a nifedipina e o diltiazem. A nifedipina (**Figura 4**), derivado da dihidropiridina, disponível somente para uso por via oral, possui potente atividade vasodilatadora periférica e coronariana, e mínimo efeito nos vasos de capacitância. Diferente do verapamil apresenta mínimo ou nenhum efeito depressor direto no nó sino-atrial ou átrio-ventricular. É metabolizada no fígado, resultando em metabólitos inativos com

eliminação predominantemente renal e em menor extensão pela bile (REVES et al, 1982).

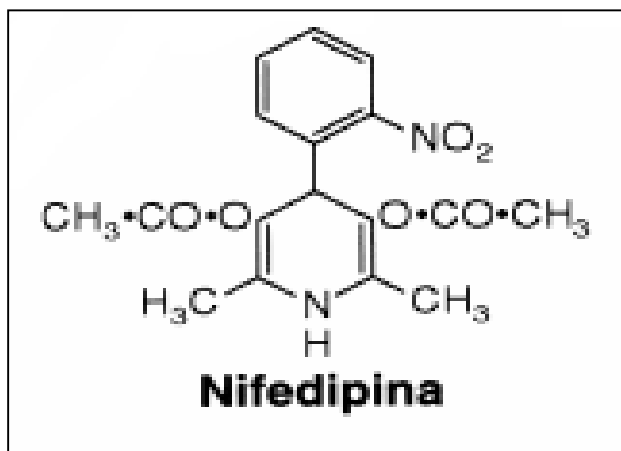


Figura 4. Fórmula estrutural da nifedipina

A significação clínica da ação da nifedipina sobre a transmissão neuromuscular e a interação com os BNM necessitam de maiores estudos. Embora pequena, a interação entre essas drogas pode ocorrer, e depende da forma de administração (aguda ou crônica), do agente anestésico empregado e da margem de segurança da transmissão neuromuscular.

A importância do conhecimento dessas interações reside na possibilidade de determinar a probabilidade de sua ocorrência no per ou no pós-operatório, e controlar a magnitude do efeito esperado. A suspensão ou não do fármaco, o ajuste de dosagem, a monitorização adequada e outras condutas devem ser tomadas para garantir a segurança do paciente.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a influência da nifedipina no bloqueio neuromuscular produzido por diferentes bloqueadores neuromusculares.

2.2 Específicos

Avaliar os efeitos da nifedipina:

- na junção neuromuscular e no músculo esquelético;
- no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina, atracúrio e cisatracúrio;
- na ação contraturante da acetilcolina;
- nos potenciais de placa terminal em miniatura;
- no potencial de membrana da fibra muscular.

Materiais e* *Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Após aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA - IB - UNICAMP (Protocolo nº 898-2 - Anexo 1) e seguindo-se as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - Anexo 2), foram utilizados ratos machos de linhagem Wistar, com peso entre 250 - 300g, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP, Campinas (SP) e pintainhos da linhagem HY LINE W36, com peso entre 40-50g (4 a 8 dias de idade) 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

- d-tubocurarina: 0,5µg/ml
- cisatracúrio: 3 µg/ml
- atracúrio: 20µg/ml
- nifedipina: 4µg/ml
- acetilcolina: 20µg/ml

3.3 Métodos Utilizados

3.3.1 Preparação Nervo Frênico-Hemidiafragma de Rato

A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por BÜLBRING (1946) para ratos. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (30-40 mg.kg⁻¹, por via intraperitoneal) e, após sangria por secção dos vasos do pescoço, procedeu-se a retirada e montagem do hemidiafragma esquerdo com porção do nervo frênico correspondente (nas preparações destinadas a estimulação indireta). A preparação foi fixada em cuba contendo 40ml de solução nutritiva de Tyrode com a seguinte composição em mM: NaCl - 137; KCl - 2,7; CaCl₂ - 1,8; NaHCO₃ - 11,9; MgCl₂ - 0,25; NaH₂PO₃ - 0,3 e glicose - 11. A solução foi aerada constantemente com carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂) e mantida a 37°C. Um eletrodo bipolar era colocado em torno do nervo frênico para a estimulação indireta com um estimulador Grass S88 (0,1 Hz de frequência, 0,2ms de duração e intensidade entre 1 e 6V). Em experimentos realizados sob estimulação elétrica direta do diafragma usou-se estímulos com 2ms de duração, 0,1Hz de frequência e intensidade de 80 V. O diafragma foi mantido por sua porção tendinosa sob uma tensão constante (5g) através de um fio ligado a um transdutor isométrico Load Cell BG 50 GMS. As respostas musculares foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400 (**Figura 5**).

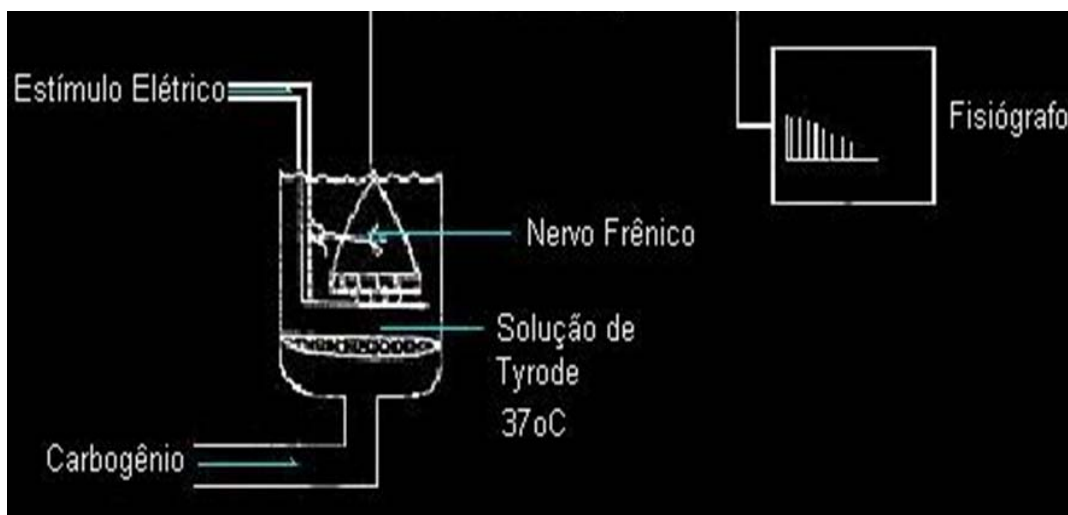


Figura 5. Esquema da preparação Nervo Frênico – Diafragma de Rato

3.3.1.1 Concentração de Nifedipina Utilizada nos Experimentos

A nifedipina é insolúvel em água e sensível a luz. Foi preparada dissolvendo-se 2mg da substância em 2ml de solução composta de 0,5ml de álcool etílico e 1,5ml de água destilada. A concentração de nifedipina utilizada no estudo foi de 4µg/ml, determinada a partir de dados apresentados nos estudos de BIKHAZI et al (1988).

3.3.1.2 Influência da Nifedipina (4µg/ml) sobre a Transmissão Neuromuscular

Após a estabilização da preparação nervo frênico-diafragma de rato e obtenção da resposta muscular controle, a nifedipina (4µg/ml) foi adicionada à preparação. Observaram-se e registraram-se as respostas musculares durante 45 minutos após a adição da nifedipina (n=5).

3.3.1.3 Influência da nifedipina (4µg/ml) no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina (0,5µg/ml), atracúrio (20µg/ml) e cisatracúrio (3 µg/ml).

Para cada bloqueador neuromuscular (BNM) estudado foram feitos experimentos avaliando-se o efeito do BNM isoladamente (n=5) e o da associação BNM - nifedipina (n=5). Em todos os experimentos sob estimulação elétrica indireta, antes da adição do BNM isoladamente ou da associação BNM - nifedipina esperou-se à estabilização da preparação e após três minutos, considerados controle, registrou-se a resposta muscular. Os percentuais de redução da amplitude das respostas musculares foram analisados após 45 minutos da adição dos fármacos estudados, e comparados aos obtidos no momento controle (antes da adição dos fármacos).

3.3.2 Influência da nifedipina sobre a ação contraturante da acetilcolina - Preparação Hemidiafragma de Rato Cronicamente Desnervado

A desnervação do diafragma foi realizada segundo a técnica descrita por VITAL BRAZIL (1965). Foram utilizados ratos com peso entre 250 a 300g. Após anestesia com halotano, os animais eram colocados em decúbito lateral direito e feita uma incisão de aproximadamente 0,5cm perpendicular à linha mediana, no terço inferior da região lateral do tórax esquerdo. A incisão compreendia a pele e a camada muscular delgada que recobre esta região. Ao longo do espaço intercostal os músculos intercostais foram cortados e com auxílio de um bastão de vidro de extremidade recurvada, o nervo frênico foi preso e tracionado para as bordas da incisão e posteriormente seccionado

com tesoura. Em seguida a pele foi suturada com um ou dois pontos conforme a extensão da incisão.

Após 15 a 20 dias da desnervação, o hemidiafragma esquerdo foi retirado segundo a técnica de BÜLBRING (1946), montado em eletrodo bipolar de maneira a aplicar estímulos diretos e suspenso em cuba de vidro contendo 40ml de solução de Tyrode, com a mesma composição, condições de aeração e temperatura descritas anteriormente.

Para obtenção da resposta muscular, estímulos elétricos diretos, supramaximais com 2ms de duração e 0,1Hz de frequência foram aplicados por meio de um estimulador GRASS modelo S88, e o registro feito em fisiógrafo GOULD modelo RS 3400. O diafragma cronicamente desnervado era mantido sob tensão de 2,5g através de um fio preso à sua porção tendinosa e ao transdutor isométrico Myograph F-60 (Narco Bio-Systems, Inc).

Após estabilização da preparação, iniciaram-se os experimentos (n=5) aplicando-se durante três minutos estímulos diretos, para obtenção da resposta muscular considerada controle. Após esse período a estimulação foi interrompida; adicionou-se à solução de Tyrode, 20µg/ml de acetilcolina (concentração capaz de provocar contratura adequada para a visualização dos resultados na preparação hemidiafragma cronicamente desnervado) e registrou-se a contratura muscular provocada pela despolarização causada pelo agonista. Quando a contratura atingiu o seu ápice, o registro foi interrompido e lavou-se a preparação quatro vezes com solução de Tyrode, para a retirada da acetilcolina. Adicionou-se à preparação nifedipina (4µg/ml), e após 30

minutos de exposição ao fármaco, foram aplicados estímulos elétricos diretos, durante três minutos, para se obter um novo controle da amplitude das respostas musculares; a estimulação foi interrompida e adicionou-se acetilcolina (20µg/ml). A resposta a acetilcolina foi comparada antes e depois da adição da nifedipina (4µg/ml).

3.3.3 Influência da nifedipina sobre a ação contraturante da acetilcolina - Preparação Músculo *Biventer Cervicis* de Pintainho

Para esta preparação foram utilizados pintainhos de 4 a 8 dias de idade com peso entre 40 e 80 gramas. Os animais foram anestesiados com halotano e sacrificados. As preparações do músculo (n=5) foram feitas de acordo com o método descrito por GINSBORG e WARRINER (1960). Após o isolamento, o músculo é retirado e fixado em uma cuba contendo 5ml de solução nutritiva de Krebs, cuja composição em mM é: NaCl - 136; KCl - 5,0; CaCl₂ - 2,5; KH₂PO₄ - 1,2; NaHPO₃ - 11,9; Glicose - 11,2. A solução é aerada constantemente com carbogênio e em temperatura de 37° C. A preparação foi mantida sob tensão de 0,5g e estimulada por meio de eletrodos bipolares (estimulação de campo).

Aplicou-se estímulos indiretos supramaximais com 0,1Hz de frequência, 0,2ms de duração e intensidade de 4 a 9V, com auxílio de estimulador GRASS modelo S88. Para o registro das respostas musculares empregou-se um transdutor isométrico ligado a um fisiógrafo GOULD modelo RS 3400.

Após estabilização das respostas, estimulou-se a preparação por três minutos para se obter um controle das respostas musculares; após este período, suspendeu-se a estimulação e adicionou-se acetilcolina (20µg/ml). Registrou-se a resposta muscular causada pelo agonista, e após ser alcançado o ápice da resposta contraturante, interrompeu-se o registro no fisiógrafo. A preparação foi lavada quatro vezes com solução de Krebs para a retirada do excesso de acetilcolina. Adicionou-se nifedipina (4µg/ml) à solução, mantendo-a em contato com a preparação durante 30 minutos. Estimulou-se a preparação durante três minutos para a obtenção de um novo controle das respostas musculares e repetiu-se o procedimento registrando-se a resposta à adição de acetilcolina (20µg/ml). Ao final do experimento compararam-se as respostas à acetilcolina obtidas antes e após a adição de nifedipina.

3.3.4 Estudos Eletrofisiológicos

Para a avaliação dos efeitos da nifedipina sobre o potencial de membrana (PM) e potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) utilizou-se hemidiafragma esquerdo com a placa terminal intacta.

3.3.4.1 Montagem da Preparação e Confecção dos Microeletrodos (Me)

A preparação é montada 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, contendo 10 ml de solução de Tyrode e aerada com carbogênio. Para a realização das observações eletrofisiológicas, a cuba foi colocada na platina do microscópio, usando-se a técnica convencional de registros com microeletrodos de vidro (FATT e KATZ, 1951). Os microeletrodos (Me) são preparados no laboratório com auxílio do “Microelectrode Puller” (modelo 8104 - Palmer), e preenchidos com KCl - 3M, tendo uma resistência entre 5 - 20M Ω , conservados em geladeira. Para sua confecção utilizaram-se tubos de vidro apropriados (capilares de vidro Clark com microcapilar interno, para facilitar o preenchimento com KCl (**Figura 6**).

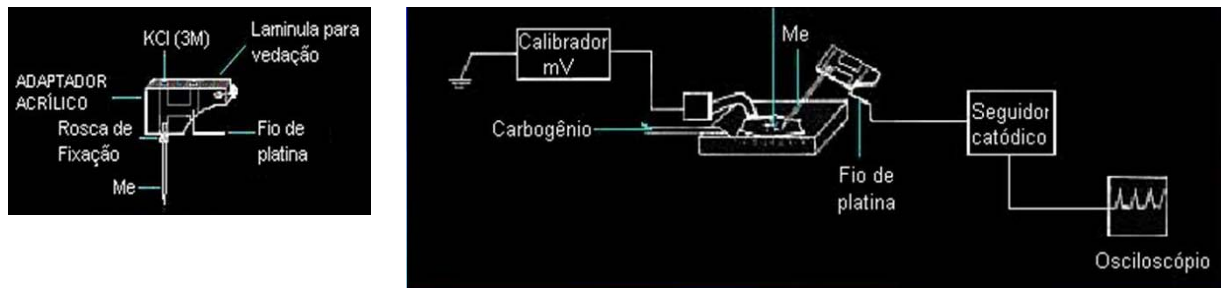


Figura 6. Microeletrodo e montagem de aparelhagem para os experimentos eletrofisiológicos

3.3.4.2 Descrição do Circuito (Figura 6)

O microeletrodo é fixado em sua extremidade posterior a um suporte apropriado de acrílico. A fixação do Me, na parte antero-inferior do suporte, é feita através de um tubo de aço inox com rosca externa e porca cônica de metal com orifício central suficiente para a introdução do Me, junto com um anel de vedação de polietileno. Na parte pósterio-inferior do suporte, sai um fio de platina que é unido a um seguidor

catódico através de um fio condutor. A conexão entre o microeletrodo e o fio de platina é feita através de um vaso comunicante preenchido com KCl (3M). Na extremidade superior do adaptador, os orifícios do vaso comunicante são vedados por uma lamínula de vidro mediante uma delgada camada de vaselina sólida. O adaptador do microeletrodo é fixado ao braço de um micromanipulador acoplado ao microscópio estereoscópio para um aumento de até 40 vezes. Este equipamento permite realizar deslocamentos horizontais e verticais controlando a introdução do microeletrodo nas fibras musculares para as medidas dos potenciais de membrana e a captação dos potenciais de placa terminal em miniatura. O seguidor catódico é posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conecta-se ao canal do osciloscópio.

A preparação e toda a aparelhagem empregada devem permanecer numa gaiola de Faraday montada sobre uma mesa rígida, fixada ao solo com a finalidade de evitar vibrações e interferências no registro feito pelo osciloscópio.

3.3.4.3 Medida da Resistência do Microeletrodo

Após ser retirado de seu suporte de estocagem, o microeletrodo é encaixado e preso em seu adaptador. Fixa-se o conjunto (Me + adaptador) no braço do micromanipulador, ligando-se o fio ao seguidor catódico.

A medida da resistência do microeletrodo é realizada mergulhando-o na solução nutritiva e introduzindo em paralelo no circuito, uma resistência de valor conhecido ($20\text{M}\Omega$). Os microeletrodos, cuja resistência medida não esteja compreendida entre 5 e $20\text{M}\Omega$, são desprezados.

3.3.4.4 Influência da nifedipina nos potenciais de membrana (PM)

Para a determinação do potencial de membrana das fibras musculares, com auxílio de microscópio, o Me deve ser inserido intracelularmente sobre as fibras musculares superficiais (em regiões distantes da placa terminal). Quando o microeletrodo é inserido nas fibras mede-se o deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio. Os potenciais de membrana foram medidos em cinco experimentos: antes da administração da nifedipina (controle) e a cada cinco minutos durante 30 minutos, após a administração do fármaco. Em cada momento, repetiu-se o procedimento em cinco fibras distintas em período não superior a um minuto, calculando-se a média e o desvio padrão dos resultados obtidos.

O potencial de membrana é determinado multiplicando-se o valor médio pelo fator de correção (fc) que é estabelecido aplicando-se ao circuito, um sinal de 100mV e medindo-se a deflexão correspondente do osciloscópio.

3.3.4.5 Influência da nifedipina nos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM)

Para a captação dos PPTM, o microeletrodo deve ser inserido junto ou o mais próximo possível da região da placa motora terminal utilizando-se o microscópio estereoscópio para auxiliar a localização da placa motora. A detecção dos PPTMs se verifica com a subida cada vez mais vertical dos registros obtidos no osciloscópio; estes

são fotografados em filme Polaroid por meio de uma “câmara osciloscope” modelo C-5A. Foram realizados cinco experimentos e os PPTMs registrados antes (controle) e após a adição da nifedipina (4µg/ml) observando-se as alterações aos 30 e aos 60 minutos.

3.3.5 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados através do cálculo de médias e desvios padrão. Para a comparação da redução das respostas musculares obtidas com os bloqueadores neuromusculares empregados isoladamente com aquela observada com a associação nifedipina-bloqueadores neuromusculares, utilizou-se o teste t de *Student* não pareado. A influência da nifedipina na resposta contraturante a acetilcolina em preparação diafragma cronicamente desnervado e *biventer cervicis* de pintainho, e a comparação dos potenciais de membrana antes e após a adição da nifedipina em preparação diafragma de rato foram avaliadas através do teste t de *Student* pareado. Assumiu-se um nível de significância de 5% ($\alpha = 5\%$). O software utilizado para análise dos dados foi o SAS versão 8.2.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da nifedipina e dos bloqueadores neuromusculares d-tubocurarina, atracúrio e cisatracúrio, nas respostas musculares em preparação nervo frênico-diafragma de rato

Em preparação nervo frênico-diafragma de rato submetida à estimulação indireta, a nifedipina na concentração de $4\mu\text{g/ml}$, administrada isoladamente, não provocou alteração na amplitude das respostas musculares (**Figura 7**).

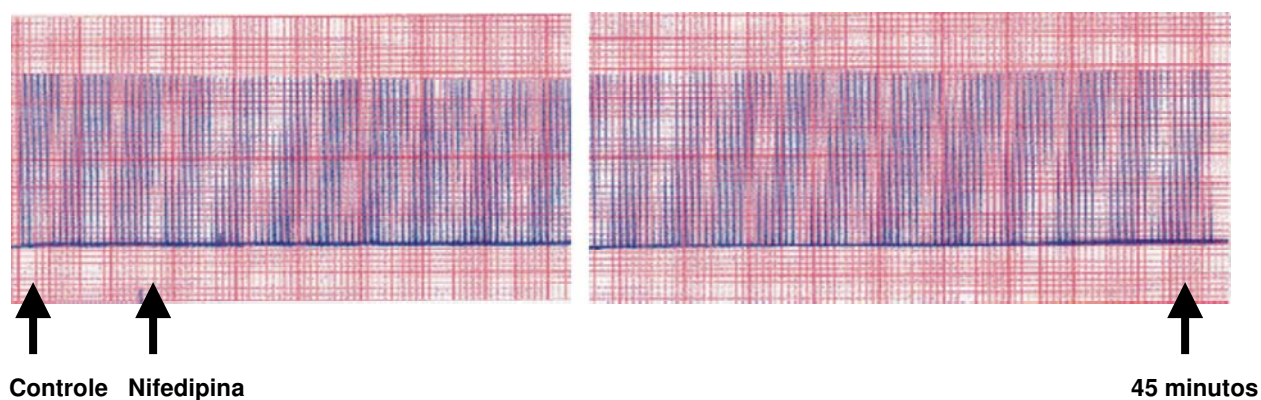


Figura 7. Efeito da nifedipina ($4\mu\text{g/ml}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ms}$), em preparações nervo frênico - diafragma de rato ($n=5$)

O atracúrio ($20\mu\text{g/ml}$), o cisatracúrio ($3\mu\text{g/ml}$) e a d-tubocurarina ($0,5\mu\text{g/ml}$) empregados isoladamente, produziram redução média de $45,02 \pm 6,33\%$, $48,01 \pm 10,33\%$ e $41,16 \pm 5,65\%$, respectivamente, na amplitude das respostas musculares (**Figuras 8, 9 e 10**).

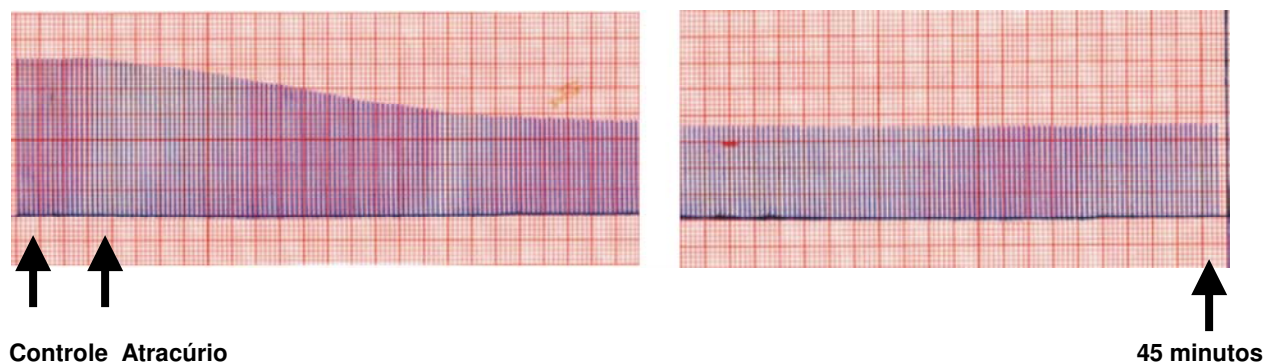


Figura 8. Efeito do atracúrio ($20\mu\text{g/ml}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ms}$), em preparações nervo frênico - diafragma de rato ($n=5$)

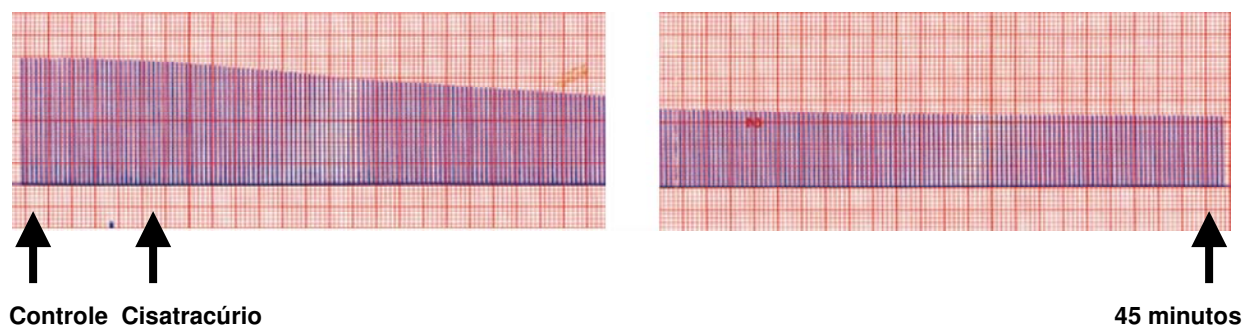


Figura 9. Efeito do cisatracúrio ($3\mu\text{g/ml}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ms}$), em preparações nervo frênico - diafragma de rato ($n=5$)

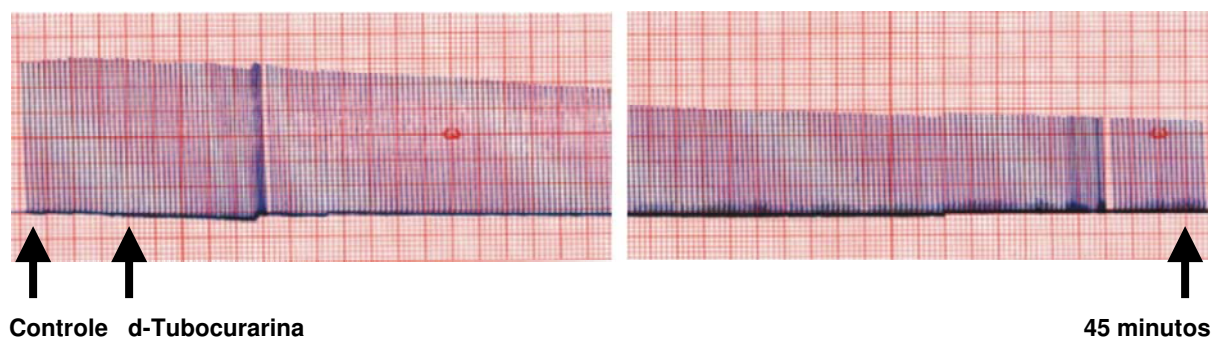


Figura 10. Efeito da d-tubocurarina (0,5µg/ml) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico - diafragma de rato (n=5)

4.2 Influência da nifedipina no bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio, cisatracúrio e d-tubocurarina, em preparação nervo frênico – diafragma de rato

A nifedipina na concentração empregada não potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina. A redução média e desvio padrão na amplitude das respostas musculares produzida pela associação nifedipina + d-tubocurarina foi de $36,7 \pm 4,08\%$ (**Figura 11**), ligeiramente menor em relação ao bloqueio produzido pela d-tubocurarina empregada isoladamente ($p= 0,1869$).

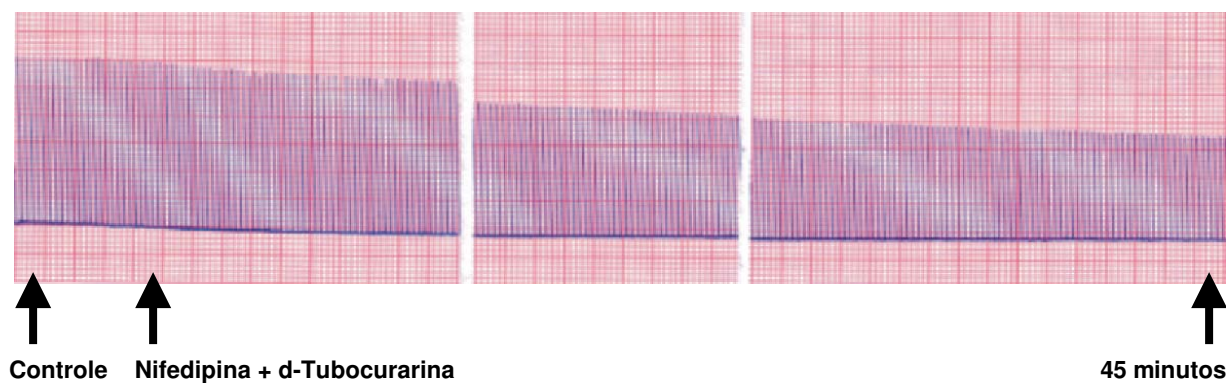


Figura 11. Efeito da associação nifedipina ($4\mu\text{g/ml}$) + d-tubocurarina ($0,5\mu\text{g/ml}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ms}$), em preparações nervo frênico - diafragma de rato ($n=5$)

A redução média e desvio padrão da amplitude das respostas musculares produzida pela associação nifedipina + atracúrio, foi de $64,19 \pm 9,37\%$, significativamente maior ($p = 0,0053$) em relação à redução observada com o atracúrio empregado isoladamente ($45,02 \pm 6,33\%$) - **Figura 12.**

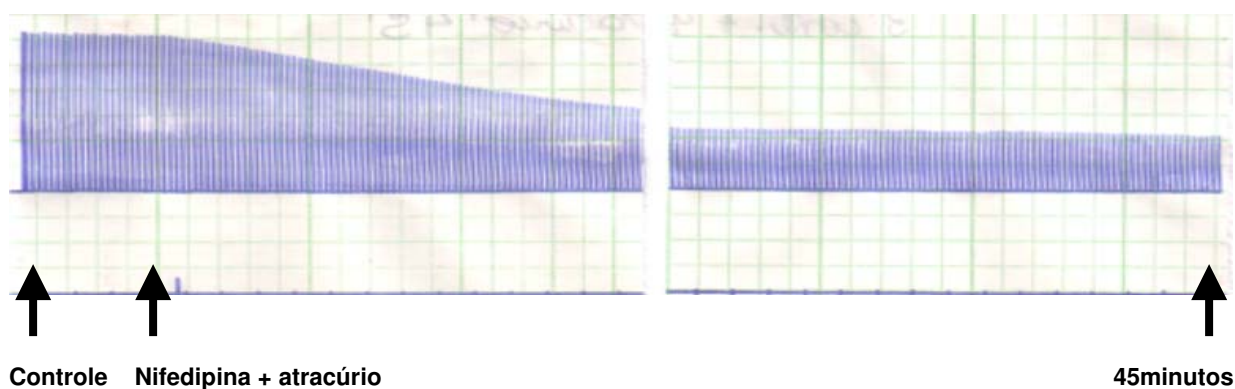


Figura 12. Efeito da associação nifedipina ($4\mu\text{g/ml}$) + atracúrio ($20\mu\text{g/ml}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ms}$), em preparações nervo frênico - diafragma de rato ($n=5$)

A associação nifedipina + cisatracúrio, causou redução média e desvio padrão de $74,04 \pm 10,12\%$ na amplitude das respostas musculares, que foi significativamente maior ($p = 0,0038$) em relação à redução observada com o cisatracúrio empregado isoladamente ($48,01 \pm 10,33\%$) - **Figura 13**.

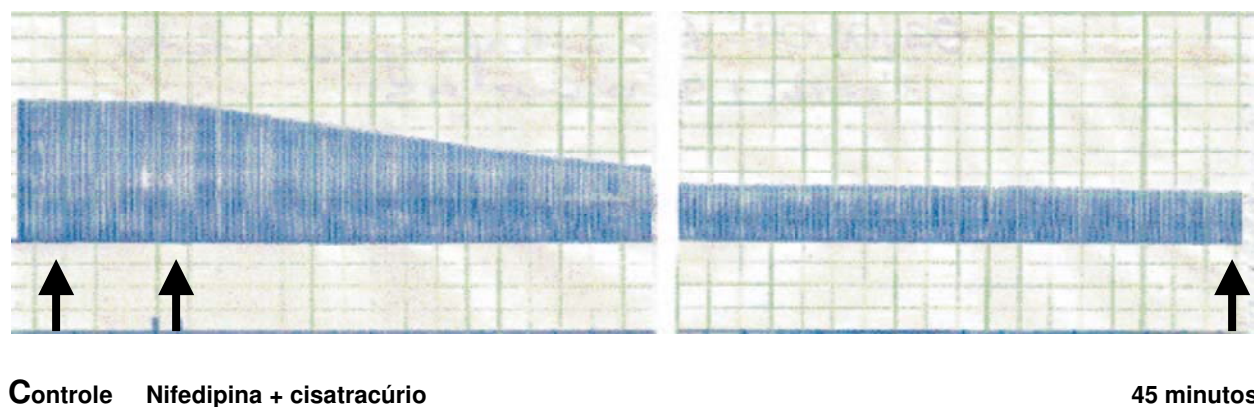


Figura 13. Efeito da associação nifedipina ($4\mu\text{g/ml}$) + cisatracúrio ($3\mu\text{g/ml}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ms}$), em preparações nervo frênico - diafragma de rato ($n=5$)

Os valores individuais, médias e desvios padrão dos percentuais de redução das amplitudes das respostas musculares a estimulação indireta das preparações nervo frênico – diafragma de rato, expostas a d-tubocurarina, ao atracúrio e ao cisatracúrio, empregadas isoladamente e em associação com a nifedipina, encontram-se nos anexos (**Tabelas 2, 3 e 4**).

4.3 Efeito da nifedipina na resposta contraturante a acetilcolina

4.3.1 Preparação *Biventer cervicis* de Pintainho

Na preparação *biventer cervicis* de pintainho foram estudadas as respostas a acetilcolina (20µg/ml) antes e 30 minutos após a adição da nifedipina (4µg/ml).

A altura média (cm) da resposta contraturante à acetilcolina, 30 minutos após a adição da nifedipina foi de $1,75 \pm 0,75$, semelhante a obtida antes da adição de nifedipina ($1,75 \pm 0,62$). A nifedipina não causou alteração significativa ($p= 0,8819$), na ação contraturante à acetilcolina, em preparação *biventer cervicis* de pintainho submetida à estimulação indireta (**Figura 14, Gráfico 1**).

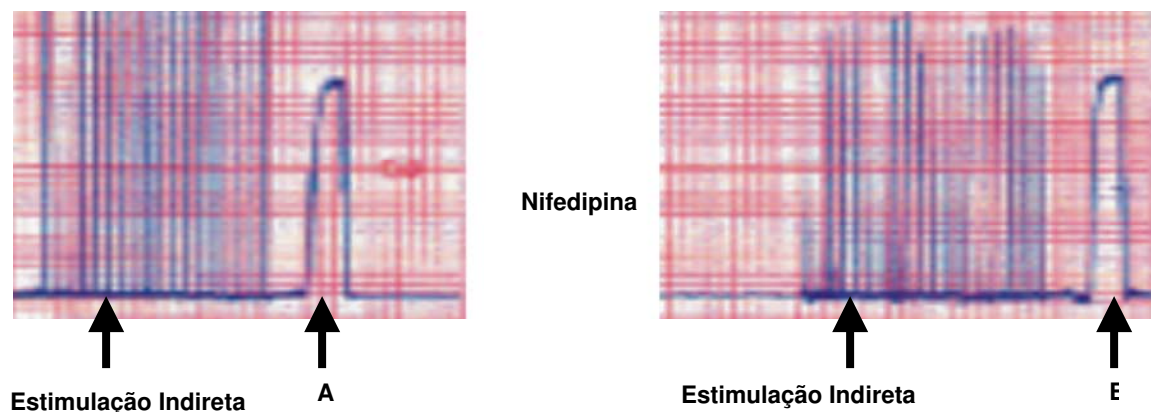


Figura 14. Registro miográfico do efeito da nifedipina (4µg/ml) sobre a curva de acetilcolina (20µg/ml) na preparação *biventer cervicis* de pintainho (n=4), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração de 0,2ms). **A**- efeito da Ach antes da nifedipina. **B**- efeito da Ach 30 minutos após nifedipina

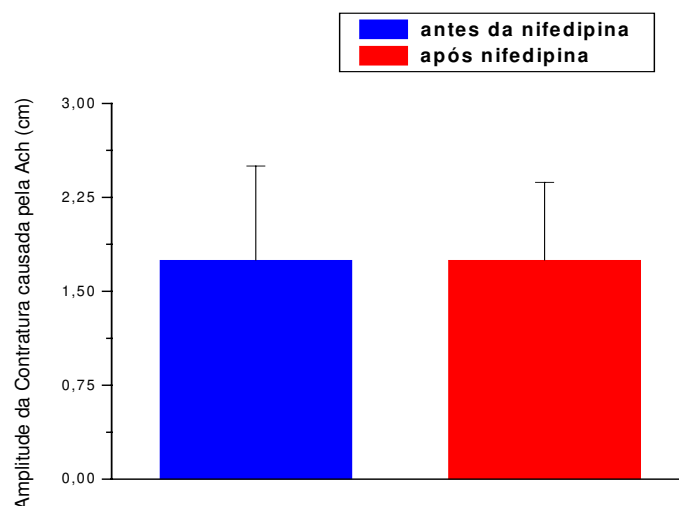


Gráfico 1. Amplitude (cm) da contratura provocada pela acetilcolina (20µg/ml) na preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a nifedipina (4µg/ml)

4.3.2 Preparação Diafragma de Rato Cronicamente Desnervado

A altura média (cm) da resposta contraturante à acetilcolina, 30 minutos após a adição da nifedipina foi de $0,67 \pm 0,34$, semelhante a obtida antes da adição de nifedipina ($0,77 \pm 0,49$). A nifedipina não causou alteração significativa ($p = 0,5137$), na ação contraturante à acetilcolina, em preparação diafragma de rato cronicamente desnervado submetida à estimulação direta (**Figura 15, Gráfico 2**).

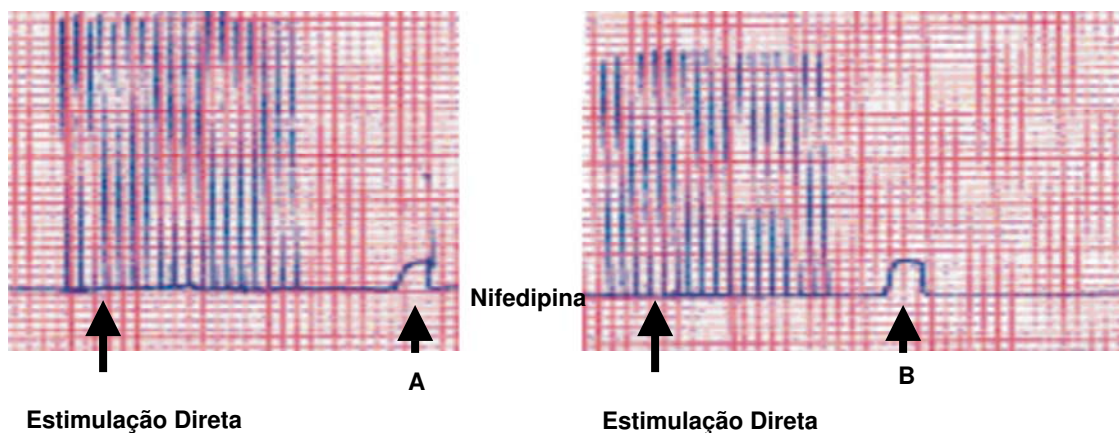


Figura 15. Registro miográfico do efeito da nifedipina (4µg/ml) sobre a curva de acetilcolina (20µg/ml) na preparação diafragma de rato cronicamente desnervado (n=4), sob estimulação elétrica direta, (frequência 0,1Hz e duração de 0,2ms). **A-** efeito da Ach antes da nifedipina. **B-** efeito da Ach 30 minutos após nifedipina

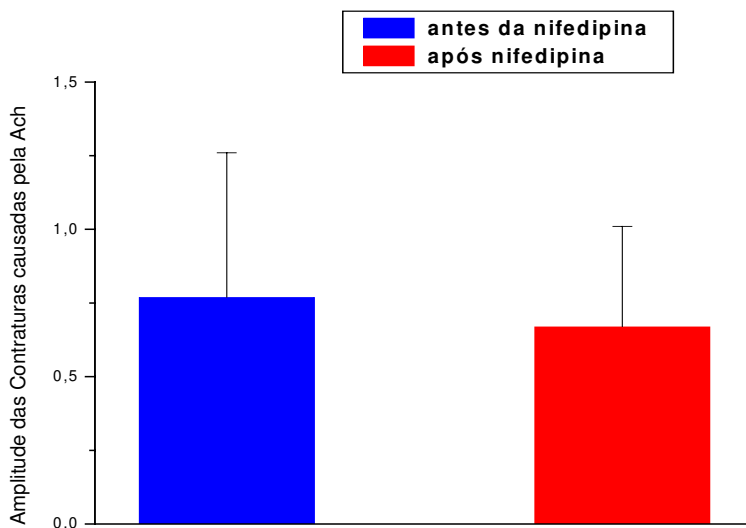


Gráfico 2. Amplitude (cm) da contratura provocada pela acetilcolina (20µg/ml) na preparação diafragma de rato cronicamente desnervado, antes e 30 minutos após a nifedipina (4µg/ml)

Os valores individuais, médias e desvios padrão das respostas contraturante à acetilcolina, antes e 30 minutos após a adição de nifedipina em preparação *biventer cervicis* de pintainho e diafragma de rato cronicamente desnervado, encontram-se nos anexos (**Tabelas 5 e 6**).

4.4 Estudos eletrofisiológicos

4.4.1 Influência da Nifedipina sobre os Potenciais de Membrana das Fibras Musculares em Diafragma de Rato

A nifedipina (4µg/ml) não causou alterações significativas nas medidas do potencial de membrana (**Tabela 1**), demonstrando que na concentração empregada esta droga não possui ação despolarizante sobre a fibra muscular (**Gráfico 3**).

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão de potencial de membrana (mV), obtidos em diafragma de rato (n=3) exposto a nifedipina (4µg/ml)

Antes da nifedipina	Após nifedipina	p
Controle - 87,33 ± 0,83	5' - 86,93 ± 1,22	0,2254
Controle - 87,33 ± 0,83	10' - 87,07 ± 0,61	0,7418
Controle - 87,33 ± 0,83	15' - 85,07 ± 2,01	0,3007
Controle - 87,33 ± 0,83	20' - 89,07 ± 5,32	0,6724
Controle - 87,33 ± 0,83	25' - 86,67 ± 2,01	0,7127
Controle - 87,33 ± 0,83	30' - 84,0 ± 1,83	0,1567

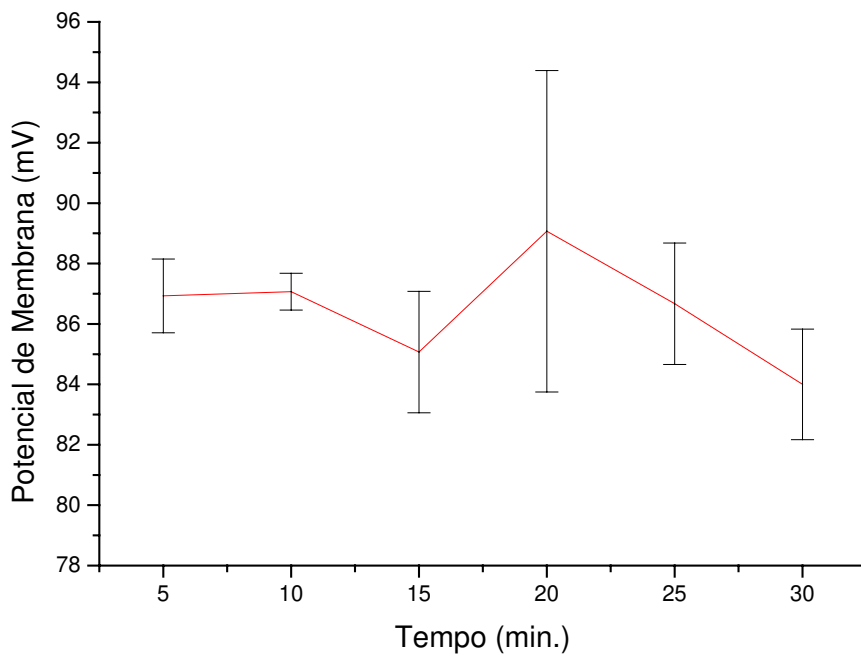


Gráfico 3. Efeitos da nifedipina ($4 \mu\text{g/ml}$) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares do diafragma de rato. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos

4.4.2 Influência da Nifedipina sobre os Potenciais de Placa Terminal em Miniatura (PPTM)

A ação da nifedipina ($4 \mu\text{g/ml}$) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura caracterizou-se, em geral, por aumento inicial da frequência desses potenciais, mas não na amplitude, seguido de bloqueio aos 60 minutos (**Figura 16**).

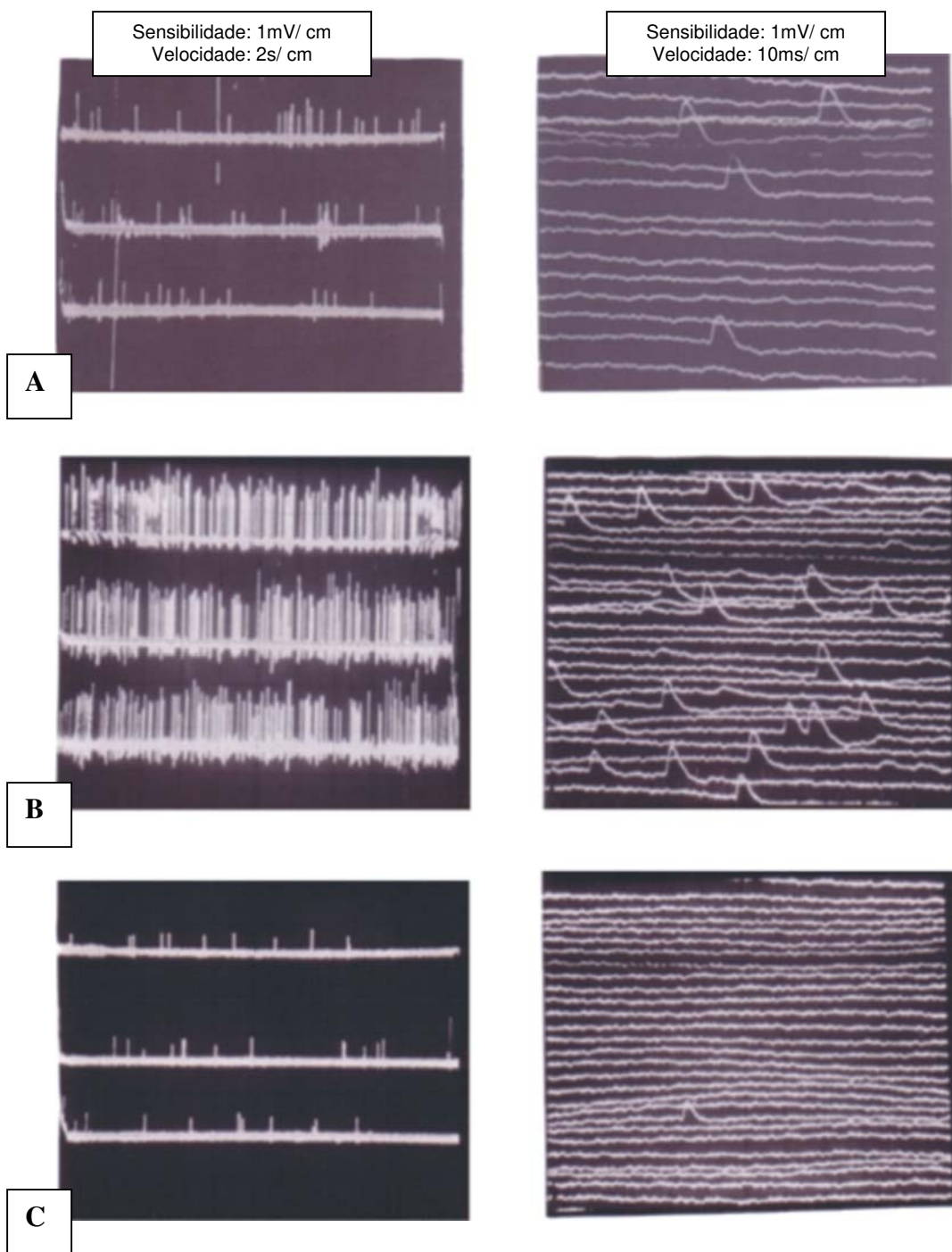


Figura 16. Efeitos da nifedipina (4 μ g/ml) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura, em diafragma de rato (n= 3). **A**- controle; **B**- 30 minutos após nifedipina; **C**- 60 minutos após nifedipina

Discussão

5. DISCUSSÃO

Há evidências de que os bloqueadores de canais de cálcio drogas amplamente utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares, podem interagir e potencializar os efeitos dos bloqueadores neuromusculares, comumente utilizados em anestesia geral (KRAYNACK et al, 1983a; KRAYNACK et al, 1983b; LAWSON et al, 1983; DURANT et al, 1984; ILIAS e STEINBEREITHNER, 1985a, 1985b; ILIAS et al, 1985; WALI, 1986a; WALI, 1986b; WALI, 1986c; WALI, 1987; BIKHAZI et al, 1988; JELEN-ESSELBORN e BLOBNER, 1990; JELEN-ESSELBORN et al, 1992; SEKERCI e TULUNAY, 1996).

Estes efeitos foram demonstrados experimentalmente, em preparações isoladas, em animal intacto, e alguns casos clínicos, também reforçam estes achados (KRAYNACK et al, 1983a; KRAYNACK et al 1983b; LAWSON et al, 1983; ZALMAN et al, 1983; DURANT et al, 1984; ANDERSON e MARSHALL, 1985; ILIAS e STEINBEREITHNER, 1985a; JONES et al, 1985; CARPENTER e MULROY, 1986; WALI, 1987; BIKHAZI et al, 1988; SALVADOR et al, 1988; JELEN-ESSELBORN e BLOBNER, 1990; JELEN-ESSELBORN et al, 1992; SEKERCI e TULUNAY, 1996). Bloqueio neuromuscular prolongado conseqüente ao uso simultâneo de bloqueadores de canais de cálcio e bloqueadores neuromusculares, foi relatado, assim como a ocorrência de quadro de insuficiência respiratória aguda, imediatamente após a administração de bloqueador de canal de cálcio, utilizado para tratamento de *flutter*

atrial, em paciente portador de distrofia muscular de Duchenne (ZALMAN et al, 1983; JONES et al, 1985).

Embora os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio tenham sido extensivamente investigados nos músculos cardíaco, vascular, respiratório e intestinal, existem poucos estudos sobre a ação destas drogas na atividade neuromuscular.

O músculo esquelético contém canais de cálcio tipo lento, similares ao observado nos músculos cardíaco e liso, com sítios especiais de ligação para os bloqueadores de canais de cálcio. Nos músculos liso e cardíaco estes canais encontram-se situados sobre toda a membrana muscular e são muito sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio, enquanto que no músculo esquelético situam-se no sistema tubular transverso, e são menos sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio (NAYLER, 1989). Devido a essas características alguns processos fisiológicos na junção neuromuscular ou no músculo podem ser alterados por estas drogas.

Na literatura têm sido propostas várias hipóteses na tentativa de esclarecer prováveis mecanismos de ação dos bloqueadores de canais de cálcio na transmissão neuromuscular e a interação com os bloqueadores neuromusculares. O cálcio é essencial para a liberação do neurotransmissor nos terminais nervosos e trabalhos realizados *in vivo* e *in vitro*, sugerem que os bloqueadores de canais de cálcio, impedem o influxo deste íon através da membrana dos canais lentos de cálcio, alterando a sua concentração e a de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) pré-sináptico, prejudicando a mobilização e a liberação do neurotransmissor e conseqüentemente inibindo a transmissão neuromuscular e a contração muscular

(STANDAERT et al, 1976; SINGH et al, 1978; RIBEIRO et al, 1979; COLVIN et al, 1982; KRAYNACK et al, 1983a; KRAYNACK et al 1983b; LAWSON et al, 1983; WALI, 1986b; WALI, 1987; ADNET e KRIVOSIC-HORBER, 1988; ESAU, 1988; PROTTI et al, 1996; SEKERCİ e TULUNAY, 1996; WANG et al, 2004).

Além de interferirem com o influxo deste íon no terminal nervoso, alguns autores acreditam que estas drogas apresentam alta atividade anestésica local, que pode também contribuir para o efeito depressor da contração muscular, provavelmente devido sua ação no canal rápido de sódio (REVES et al, 1982; JONES et al, 1985; SEKERCİ e TULUNAY, 1996). No entanto essa ação em canais rápidos de sódio e a propriedade anestésica local foram descritas apenas para o verapamil e para o bepridil, enquanto a nifedipina, uma dihidropiridina, parece ter seletividade somente para os canais de cálcio (LABRID et al, 1979; HAY e WADSWORTH, 1982). As dihidropiridinas agem principalmente nos portões voltagem-dependente situados na superfície externa da membrana celular, bloqueando-os e impedindo a entrada do cálcio na célula (CARPENTER e MULROY, 1986; WALSH et al, 1986; ADNET e KRIVOSIC-HORBER, 1988; PROTTI et al, 1996).

Relatos na literatura mostram que o verapamil reduz a liberação de acetilcolina na terminação nervosa motora, sugerindo uma ação pré-sináptica (STANDAERT et al, 1976; KRAYNACK et al, 1983a; JONES et al, 1985). Em outros trabalhos várias explicações têm sido propostas para os efeitos diretos do verapamil no músculo esquelético. Esta droga ao atuar em canais de cálcio no músculo esquelético, previne a entrada de cálcio nas células musculares, prejudicando o mecanismo de ativação e

consequentemente o processo de excitação-contração (DONALDSON E BEAM, 1983; CARPENTER e MULROY, 1986; WALSH et al, 1986). Alternativamente, CHIARANDINI E BENTLEY (1973) relataram que o verapamil em preparação isolada de sapo, bloqueia a resposta muscular induzida pela acetilcolina e sugere que de modo semelhante aos bloqueadores neuromusculares competitivos, pode ter um efeito sobre os canais iônicos ativados pela acetilcolina na placa terminal, refletindo um efeito pós-juncional. Este efeito também foi confirmado por outros autores, que observaram que os bloqueadores de canais de cálcio, mesmo em doses incapazes de modificar a condução nervosa, potencializaram o bloqueio neuromuscular produzido pelo vecurônio e bloquearam a resposta contraturante a acetilcolina (ANDERSON e MARSHALL,1985; BIKHAZI et al, 1985).

Por outro lado, achados de que os efeitos inibitórios do verapamil nas respostas musculares a estimulação indireta, são maiores do que em relação às obtidas com os estímulos diretos, podem representar que o bloqueador de canal de cálcio também atua diretamente no nervo (KRAYNACK et al, 1983b; WALI, 1986b). Adicionalmente o fato dos bloqueadores de canais de cálcio serem capazes de penetrar nas células musculares, confere a possibilidade desses antagonistas exercerem secundariamente ações no interior da fibra muscular particularmente no retículo sarcoplasmático. Entre essas drogas o bepridil e o verapamil penetram e se acumulam mais rapidamente no músculo do que a nifedipina e o diltiazem, que o fazem mais lentamente (FAIRHURST et al, 1983; PANG e SPERELAKIS, 1983).

Neste estudo, a nifedipina na concentração empregada e administrada isoladamente não produziu comprometimento da transmissão neuromuscular, mas potencializou os efeitos dos bloqueadores neuromusculares. Estes resultados são semelhantes aos observados por outros autores que observaram em experimentos realizados *in vitro* e em *in vivo*, mínima ou nenhuma influência dos bloqueadores de canais de cálcio nas respostas musculares a estímulos isolados (GONZALEZ-SERRATOS et al, 1982; FAIRHURST et al, 1983; DURANT et al, 1984; ANDERSON e MARSHALL, 1985; BIKHAZI et al, 1985; BIKHAZI et al, 1988; SEKERCİ e TULUNAY, 1996). No entanto são contrários aos de DEL POZO E BAEYENS (1986), que estudaram em preparação nervo frênico-diafragma de rato, os efeitos de várias concentrações de nifedipina, verapamil e diltiazem, e observaram diminuição concentração-dependente das respostas do músculo diafragma a estimulação indireta. Resultados similares também foram evidenciados em outros estudos experimentais utilizando outros bloqueadores de canais de cálcio (KRAYNACK et al, 1983a, 1983b; LAWSON et al, 1983; SALVADOR et al, 1988; SEKERCİ e TULUNAY, 1996).

Concentrações (*in vitro*) ou doses (*in vivo*) de verapamil ou nifedipina que isoladamente apresentaram pequenos ou nenhum efeito na resposta muscular, aumentaram a potência do atracúrio, vecurônio e pancurônio, evidenciado por uma diminuição da DE_{50} destas drogas, efeito esse considerado mais que aditivo (BIKHAZI et al, 1985; BIKHAZI et al, 1988; JELEN-ESSELBORN e BLOBNER, 1990; JELEN-ESSELBORN et al, 1992).

A semelhança de estudos anteriores, nos quais os efeitos dos bloqueadores neuromusculares foram potencializados pelos antagonistas de cálcio, a nifedipina potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e pelo cisatracúrio. Esta potencialização, no entanto não foi observada quando do emprego da d-Tubocurarina.

As diferentes respostas em relação aos efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio na potencialização dos bloqueadores neuromusculares, já foram anteriormente descritas (SEKERCI e TULUNAY, 1996). Estes autores estudaram em preparação nervo frênico – diafragma de rato os efeitos do verapamil e da nicardipina, no bloqueio neuromuscular produzido pelo vecurônio, atracúrio e pancurônio, e observaram que estes antagonistas potencializaram os efeitos do atracúrio e do vecurônio, sem, no entanto alterar o bloqueio ocasionado pelo pancurônio.

É difícil explicar, porque os antagonistas do cálcio são capazes de potencializar os efeitos de alguns agentes bloqueadores neuromusculares não competitivos e não exercer efeitos em outros, mesmo que pertencentes ao mesmo grupo. É provável que diferentes afinidades dos agentes bloqueadores neuromusculares para os receptores pré e pós-sinápticos, ou algum outro efeito desconhecido dos bloqueadores de canais de cálcio, sejam responsáveis pelos diferentes resultados (SEKERCI e TULUNAY, 1996). A grande diferença na afinidade pelos receptores, existente entre os bloqueadores neuromusculares, foi demonstrada em homens, sugerindo que outros mecanismos além dos farmacocinéticos, possam ser responsáveis pelos diferentes

graus e duração do bloqueio neuromuscular produzidos por estas drogas (FAWCETT et al, 1993; FELDMAN et al, 1993; CAMPKIN et al, 1994).

Como demonstrado para o bepridil, parece pouco provável que o aumento do fluxo sanguíneo para os músculos, ocasionado pelos bloqueadores de canais de cálcio, contribua para este sinergismo, intensificando os efeitos dos bloqueadores neuromusculares, quer seja aumentando o grau de bloqueio, como encurtando o seu início de ação (ZSOTER et al, 1977; ANDERSON e MARSHALL, 1985). Estes autores relataram que outras drogas vasodilatadoras, como o nitroprussiato de sódio, que também aumenta o fluxo sanguíneo muscular, não interferem na magnitude e na instalação do bloqueio neuromuscular produzido pelo vecurônio, sendo interessante ressaltar que o mecanismo responsável pela ação vasodilatadora do nitroprussiato não está relacionado à inibição de canais de cálcio (ZSOTER et al, 1977).

Neste estudo, os efeitos da nifedipina também foram avaliados em outras preparações buscando-se os prováveis mecanismos dessa interação. As preparações *biventer cervicis* de pintainho e diafragma de rato cronicamente desnervado permitem avaliar a afinidade da nifedipina pelos receptores nicotínicos pós-sinápticos. A atividade pós-sináptica pode ser identificada pela ausência de resposta aos agonistas colinérgicos, sem afetar as respostas ao aumento de concentração de potássio ou à estimulação direta (BARRET e HARVEY, 1979).

A preparação *biventer cervicis* de pintainho possui características diferentes das preparações em mamíferos. Enquanto nestas últimas a inervação da junção neuromuscular é focal, ou seja, possui uma região de placa terminal na qual o nervo se

ramifica em um local especializado do músculo, onde se localizam os receptores de acetilcolina, nas aves a inervação é multifocal, isto é, encontram-se receptores para esse neurotransmissor ao longo de toda a fibra muscular. Existe, então, uma densidade de receptores colinérgicos maior na junção neuromuscular de aves do que na de mamíferos. Por isso, essa preparação possui um comportamento peculiar frente aos agonistas desses receptores.

Esta alta densidade de receptores também é observada em preparação diafragma de rato cronicamente desnervado, e é útil para complementar os achados em preparação de aves, relacionados à influência da droga estudada sobre o comportamento dos receptores para a acetilcolina. A desnervação crônica do diafragma de rato causa uma neoformação de receptores nicotínicos ao longo de toda a fibra muscular aumentando de forma considerável a sensibilidade química do músculo diafragma ao neurotransmissor colinérgico (VITAL BRASIL, 1965). A preparação passa a responder a estímulos químicos de forma semelhante às preparações de inervação multifocal. A diferença entre as preparações, deve-se ao fato da preparação desnervada não apresentar terminal pré-sináptico da junção neuromuscular e, portanto, o comportamento observado na preparação indicará somente eventos pós-sinápticos.

Devido à alta densidade de receptores, os agonistas provocam uma despolarização sustentada na fibra muscular e a resposta observada é uma contratura muscular (encurtamento das fibras musculares) que se deve ao influxo de íons cálcio para estas células. Este tipo de comportamento se diferencia da contração muscular normal, pois nesta última, a despolarização rápida da placa terminal gera um potencial

de ação que se propaga pela fibra muscular e, na contratura, a despolarização é sustentada, lenta e não se propaga, mas ocorre em todos os locais da fibra onde existem os receptores para a acetilcolina (GINSBORG e WARRINER, 1960; VITAL BRASIL, 1965; BOWMAN, 1980; BOWMAN, 1994; MIRANDA et al, 2000).

Os resultados observados nestas preparações, em que a nifedipina na concentração empregada não alterou a resposta contraturante a acetilcolina, podem sugerir que a interação com bloqueadores neuromusculares não seja atribuída a um mecanismo competitivo entre o antagonista de cálcio e o neurotransmissor, descartando uma possível ação pós-sináptica da nifedipina. Pode-se inferir que a ação da nifedipina seja exclusivamente pré-juncional, e portanto diferente do relatado por ANDERSON e MARSHALL (1985), que observaram bloqueio na resposta a acetilcolina, e atribuíram esse efeito mais a uma ação pós-sináptica, do que na condução nervosa ou a um prejuízo na liberação de acetilcolina.

Nos estudos eletrofisiológicos, observamos que a nifedipina na concentração empregada não produz alterações nas medidas do potencial de membrana das fibras musculares, demonstrando não possuir ação despolarizante sobre a fibra muscular, e que seu mecanismo de ação na junção neuromuscular não está envolvido com uma atividade estabilizadora de membrana muscular.

Em relação aos potenciais de placa terminal em miniatura, observou-se que inicialmente a nifedipina causou um aumento na frequência desses potenciais, seguido de bloqueio. Estes resultados podem sugerir que a nifedipina possui atividade pré-sináptica, que leva a um discreto aumento na liberação de acetilcolina. É possível que

este aumento inicial na concentração do neurotransmissor na fenda sináptica e seu contacto prolongado com o receptor da placa terminal, possa ocasionar dessensibilização destes receptores e consequentemente bloqueio.

O fenômeno de dessensibilização dos receptores pós-sinápticos, foi à denominação dada ao mecanismo pelo qual o bloqueio neuromuscular é causado pela interação prolongada dos receptores com a acetilcolina e análogos, não devido à persistência da despolarização da placa terminal, mas ao fato dessa região tornar-se insensível a ação despolarizante da acetilcolina (THESLEFF, 1955a; THESLEFF, 1955b; PAVANI, 1983).

Os resultados deste estudo vão de encontro aos de outros autores que observaram aumento ou diminuição na freqüência dos potenciais de placa terminal em miniatura, dependente do emprego do verapamil em baixas ou altas concentrações, respectivamente (HÖFLING et al, 1976; PUBLICOVER e DUNCAN, 1979).

Resultados de estudos *in vivo* com a associação de bloqueadores de canais de cálcio e bloqueadores neuromusculares, sugerem que a interação entre esses dois grupos de drogas pode diferir de acordo com a forma de administração do bloqueador de canal de cálcio. O uso crônico pode possibilitar seu acúmulo nos músculos e grande parte do bloqueio pode ser atribuído ao antagonista de cálcio. O emprego de maneira aguda pode aumentar temporariamente o grau de bloqueio neuromuscular, sem, no entanto prolongar sua duração (BIKHAZI et al, 1988).

O sinergismo evidenciado entre os fármacos estudados e expresso pela potencialização do efeito dos bloqueadores neuromusculares pode refletir um aumento da eficácia ligação curare-receptor, quando a preparação é tratada com bloqueadores de canais de cálcio. A exposição a estes antagonistas pode causar um decréscimo do número de receptores disponíveis a acetilcolina diminuindo a margem de segurança da junção neuromuscular e facilitando a ação dos bloqueadores neuromusculares.

Os Anestesiologistas podem em algum momento se deparar com esta interação, quando da realização de anestesia em pacientes em uso crônico de bloqueadores de canais de cálcio ou mesmo diante da necessidade do uso destas drogas para tratamento de intercorrências cardiocirculatórias durante o ato anestésico-cirúrgico. Os resultados deste estudo sugerem que o Anestesiologista deve estar alerta para a possível interação entre bloqueadores de canais de cálcio e bloqueadores neuromusculares, particularmente em pacientes fazendo uso crônico de bloqueadores de canais de cálcio.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados neste trabalho sobre os efeitos da nifedipina na junção neuromuscular e a sua influência nos efeitos dos bloqueadores neuromusculares, d-tubocurarina, atracúrio e cisatracúrio, pôde-se concluir que a nifedipina na concentração estudada:

1. Não comprometeu a transmissão neuromuscular, mas potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e pelo cisatracúrio;
2. Não alterou o potencial de membrana, demonstrando que o local de ação é na junção neuromuscular e não na fibra muscular;
3. Não alterou a resposta contraturante da acetilcolina, demonstrando ausência de efeito direto nos receptores colinérgicos pós-sinápticos;
4. Apresentou efeito pré-sináptico refletido por alterações nos potenciais de placa terminal em miniatura.

As conclusões podem sugerir uma interação do tipo sinergismo entre bloqueador de canal de cálcio e bloqueadores neuromusculares, e deve ser levada em consideração quando do uso simultâneo destas drogas na prática clínica.

Referências
BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNET P, KRIVOSIC-HORBER R. Calcium inhibitors and anesthesia. ***Ann Fr Anesth Reanim***, 1988; 7:494-505.

ALI HH, SAVARESE JJ, BASTA SJ, SUNDER N, GIONFRIDDO M. Evaluation of cumulative properties of three new nondepolarizing neuromuscular blocking drugs BW A444U, atracurium and vecuronium. ***Br J Anaesth***, 1983; 55: 107S-111S.

ANDERSON KA, MARSHALL RJ. Interactions between calcium entry blockers and vecuronium bromide in anaesthetized cats. ***Br J Anaesth***, 1985; 57:775-781.

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.

BARRETT JC, HARVEY AL. Effects of the venom of the green mamba, *Dendroaspis angusticeps* on skeletal muscle and neuromuscular transmission. ***Br J Pharmacol***, 1979; 67:199-205.

BASTA SJ, ALI HH, SAVARESE JJ, SUNDER N, GIONFRIDDO M, CLOUTIER G et al. Clinical pharmacology of atracurium besylate (BW 33A): a new non-depolarizing muscle relaxant. ***Anesth Analg***, 1982; 61: 723-729.

BASTA SJ, SAVARESE JJ, ALI HH, EMBREE PB, SCHWARTZ AF, RUDD GD et al. Clinical pharmacology of doxacurium chloride. A new long - acting nondepolarizing muscle relaxant. ***Anesthesiology***, 1988; 69:478-486.

BELL PF, MIRAKHUR RK, ELLIOTT P. Onset and duration of clinical relaxation of atracurium and vecuronium in patients on chronic nifedipine therapy. ***Eur J Anaesthesiol***, 1989; 6: 343-346.

* ***Referências Bibliográficas segundo normatização de Vancouver***

BELMONT MR, MAEHR RB, WASTILA WB, SAVARESE JJ. Farmacodinâmica e farmacocinética dos 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.

BELMONT MR, LIEN CA, QUESSY S, ABOU-DONIA MM, ABALOS A, EPPICH L et al. The clinical neuromucular pharmacology of 51W89 in patients receiving nitrous oxide/opioid/barbiturate anesthesia. ***Anesthesiology***, 1995; 82: 1139-1145.

BEVAN DR. Newer neuromuscular blocking agents. ***Pharmacol & Toxicol***, 1994; 74: 3-9.

BIKHAZI GB, FLORES C, FOLDES FF. The effects of verapamil and EGTA on the rat phrenic nerve hemidiaphragm preparation. ***Anesth Analg***, 1985; 64: 505-508.

BIKHAZI GB, LEUNG I, FLORES C, MIKATI HMJ, FOLDES FF. Potentiation of neuromuscular blocking agents by calcium channel blockers in rats. ***Anesth Analg***, 1988; 67:1-8.

BOURILLET F, CHEYMOL J. Pharmacologie des substances curarisantes, Curare – ***Symposium der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften***, Schwabe Ca-veriag, Brasil/Stuttgart, 1966; 463-485.

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

BOWMAN WC. The neuromuscular junction: Basic physiology and pharmacology. In: NIMMO WS. ***Anesthesia***. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. p 371-395.

BULBRING E. Observation on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. ***Br J Pharmacol***, 1946; 1:38-61.

CAMPKIN NT, HOOD JR, FELDMAN SA. Recovery of mivacurium and doxacurium versus vecuronium in the isolated forearm. **Anaesthesia**, 1994; 49:501-502.

CARPENTER RL, MULROY MF. Edrophonium antagonizes combined lidocaine-pancuronium and verapamil-pancuronium neuromuscular block in cats. **Anesthesiology**, 1986; 65: 506-510.

CHANG CC, CHION LC, HWANG LL. Mechanisms of the synergistic interactions between organic calcium channel antagonists and various neuromuscular blocking agents. **Jpn J Pharmacol**, 1990; 53: 285.

CHAPPLE DJ, CLARK JS. Pharmacological action of breakdown products of atracurium and related substances. **Br J Anaesth**, 1983; 55:11S-15S.

CHIARANDINI DJ, BENTLEY PJ. The effects of verapamil on metabolism and contractility of the toad skeletal muscle. **J Pharmacol Exp Ther**, 1973; 186:52-59.

COLVIN RA, PEARSON N, MESSINEO FC, KATZ AM. Effects of Ca channel blockers on Ca transport and Ca ATPase in skeletal and cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. **J Cardiovasc Pharmacol**, 1982; 4:935-941.

DEL POZO E, BAEYENS JM. Effects of calcium channel blockers on neuromuscular blockade induced by aminoglycoside antibiotics. **Eur J Pharmacol**, 1986; 128: 49-54.

DONALDSON PL, BEAM KG. Calcium currents in a fast-twitch skeletal muscle of the rat. **J Gen Physiol**, 1983; 82: 449-468.

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

DURANT NN, NGUYEN N, KATZ RL. Potentiation of neuromuscular blockade by verapamil. **Anesthesiology**, 1984; 60:298-303.

EASTWOOD NB, BOYD AH, PARKER CJ, HUNTER JM. Pharmacokinetics of IR-cis 1'R-cis atracurium besylate (51W89) and plasma laudanosine concentrations in health and chronic renal failure. **Br J Anaesth**, 1995; 75: 431-435.

ESAU SA. Interaction of theophylline, verapamil, and diltiazem on hamster diaphragm muscle force in vitro. **Am J Physiol**, 1988; 254:C365-371.

FAIRHURST AS, THAYER SA, COLKER JE, BEATTY DA. A calcium antagonist drug binding site in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum: evidence for a calcium channel. **Life Sci**, 1983; 32:1331-1339.

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

FAWCETT WJ, FAUVEL NJ, FELDMAN SA. Comparison of recovery index of rocuronium or vecuronium with simultaneously administered pancuronium in the isolated forearm. **Anaesthesia**, 1993; 48:200-201.

FELDMAN SA, FAUVEL NJ, HOOD JR. Recovery from pancuronium and vecuronium administered simultaneously in the isolated forearm and the effect on recovery following administration after cross-over of drugs. **Anesth Analg**, 1993; 76:92-95.

FISHER DM. Clinical pharmacology of neuromuscular blocking agents. **Am J Health-Syst Pharm**, 1999; 56: (Suppl 1), 4-9.

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

GONZALEZ-SERRATOS H, VALLE-AGUILERA R, LATHROP DA, GARCIA MC. Slow inward calcium currents have no obvious role in muscle excitation-contraction coupling. **Nature**, 1982; 298:292-294.

GRIFFITHS RB, HUNTER JM, JONES RS. Atracurium infusions in patients with renal failure on an ITU. **Anaesthesia**, 1986; 41: 375-381.

HAY DW, WADSWORTH RM. Local anaesthetic activity of organic calcium antagonists: relevance to their actions on smooth muscle. **Eur J Pharmacol**, 1982; 77:221-228.

HÖFLING B, RENNER H, WESTPHAL W. Changes in neuromuscular transmission in mammalian skeletal muscle induced by iproveratril (verapamil). **Pflügers Arch**, 1976; 365:29.

HUGHES R, CHAPPLE DJ. The pharmacology of atracurium a new competitive neuromuscular blocking agent. **Br J Anaesth**, 1981; 53: 31-44.

HUNTER JM. New Neuromuscular Blocking Drugs. **N Engl J Med**, 1995; 332: 1691-99.

HUNTER JM, EASTWOOD NB, BOYD AH, PARKER CJ. Pharmacokinetics of 51W89: preliminary data. **Acta Anaesthesiol Scand**, 1995; 39: 94.

ILIAS W, STEINBEREITHNER K. Potentiation of pancuronium induced neuromuscular blockade by calcium channel blockers in vitro. **J Neural Transm**, 1985a; 64:285-293.

ILIAS W, STEINBEREITHNER K. Interaction of the calcium antagonists nifedipine and nisoldipine with the nondepolarizing muscle relaxant vecuronium bromide in an vivo rat preparation. **Anaesthesist**, 1985b; 34:588-590.

ILIAS W, LACKNER F, ZEKERT F. Nifedipine and vecuronium bromide. How does a patient treated with calcium antagonists react to nondepolarizing muscle relaxants? Brief scientific communication. **Anaesthesist**, 1985; 34:591-592.

JELEN-ESSELBORN S, BLOBNER M. Potentiation of nondepolarizing muscle relaxants by nifedipine iv in inhalation anesthesia. **Anaesthesist**, 1990; 39:173-178.

JELLEN-ESSELBORN S, BLOBNER M, HOLZL J, FELBER AR. Nifedipine prolongs a neuromuscular blockade caused by atracurium. **Anaesthesiol Reanim**, 1992; 17:195-205.

JONES RM, CASHMAN JN, CASSON WR, BROADBENT MP. Verapamil potentiation of neuromuscular blockade: failure of reversal with neostigmine but prompt reversal with edrophonium. **Anesth Analg**, 1985; 64:1021-1025.

KRAYNACK BJ, LAWSON NW, GINTAUTAS J, TJAY HT. Effects of verapamil on indirect muscle twitch responses. **Anesth Analg**, 1983a; 62:827-830.

KRAYNACK BJ, LAWSON NW, GINTAUTAS J. Neuromuscular blocking action of verapamil in cats. **Can Anaesth Soc J**, 1983b; 30:242-247.

LABRID C, GROSSET A, DURENG G, MIRONNEAU J, DUCHENE-MARULLAZ P. Some membrane interactions with bepridil, a new antianginal agent. **J Pharmacol Exp Ther**, 1979; 211: 546-554.

LAWSON NW, KRAYNACK BJ, GINTAUTAS J. Neuromuscular and electrocardiographic responses to verapamil in dogs. **Anesth Analg**, 1983; 62:50-54.

LIEN CA, BELMONT MR, ABALOS A, EPPICH L, QUESSY S, ABOU-DONIA MM et al. The cardiovascular effects and histamine-releasing properties of 51W89 in patients receiving nitrous oxide/opioid/barbiturate anesthesia. **Anesthesiology**, 1995; 82: 1131-1138.

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

MERETOJA AO, TAIKAINEN T, WIRTAVUORI K. Pharmacodynamic effects of 51W80, an isomer of atracurium, in children under halothane anesthesia. **Br J Anaesth**, 1995; 74: 6-11.

MILLER RD, RUPP SM, FISHER DM, CRONNELLY R, FAHEY MR, SOHN YJ. Clinical Pharmacology of vecuronium and atracurium. **Anesthesiology**, 1984; 61: 444-453.

MILLER RD, VON EHRENBURG W. The contribution of muscle relaxants to the advancement of anaesthetic practice: what is required of new compounds? **Eur J Anesthesiol**, 1994; 11: 1-8.

MIRAKHUR RK, LAVERY GG, CLARKE RS, GIBSON FM, MCATEER E. Atracurium in clinical anaesthesia: effect of dosage on onset, duration and conditions for tracheal intubation. **Anaesthesia**, 1985; 40: 801-805.

MIRANDA FG, MARÍN JS, ARÄNÓ JA. Neurofisiologia de la union neuromuscular. In GÓMEZ JAA, MIRANDA FG, BOZZO RB. **Relajantes Musculares Em Anestesia Y Terapia Intensiva**. Madrid: Aran, 2000, p 61-70.

NAYLER WG. Tissue-selectivity. In: NAYLER WG. **Calcium antagonists**, 2nd . London: Harcourt Brace Jovanovich Publishers, 1989: 113-29.

PANG DC, SPERELAKIS N. Nifedipine, diltiazem, bepridil and verapamil uptakes into cardiac and smooth muscles. **Eur J Pharmacol**, 1983; 87:199-207.

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 Doutorado**. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 103p; 1983.

PROTTI DA, REISIN R, MACKINLEY TA, UCHITEL OD. Calcium channel blockers and transmitter release at the normal human neuromuscular junction. **Neurology**, 1996; 46:1391-1396.

PUBLICOVER SJ, DUNCAN CJ. The action of verapamil on the rate of spontaneous release of transmitter at the frog neuromuscular junction. ***Eur J Pharmacol***, 1979; 54:119-127.

REVES JG, KISSIN I, LELL WA, TOSONE S. Calcium entry blockers: uses and implications for anesthesiologists. ***Anesthesiology***, 1982; 57:504-518.

RIBEIRO JA, DOMINGUES ML, GONÇALVES MJ. Purine effects at the neuromuscular junction and their modification by theophylline, imidazole and verapamil. ***Archives Internacionales Pharmacodynamie et Therapie***, 1979; 238: 206-219.

SALVADOR A, DEL POZO E, CARLOS R, BAEYENS JM. Differential effects of calcium channel blocking agents on pancuronium and suxamethonium - induced neuromuscular blockade. ***Br J Anaesth***, 1988; 60: 495-499.

SAVARESE JJ, WASTILA WB. The future of the benzylisoquinolinium relaxants. ***Acta Anaesthesiol Scand***, 1995; 39: 91-93.

SEKERCI S, TULUNAY M. Interactions of calcium channel blockers with non-depolarizing muscle relaxants in vitro. ***Anaesthesia***, 1996; 51: 140-144.

SINGH BN, ELLRODT G, PETER CT. Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. ***Drugs***, 1978; 15:169-197.

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

STANDAERT FG, DRETCHEN KL, SKIRBOLL LR, MORGENROTH VH. A role of cyclic nucleotides in neuromuscular transmission. ***J Pharmacol Exp Ther***, 1976; 199:553-564.

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

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.

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

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

TSUI D, GRAHAM GG, TORDA TA. The pharmacokinetics of atracurium isomers in vitro and in humans. **Anesthesiology**, 1987; 67: 722-728.

VAN POORTEN JF, DHASMANA KM, KUYPERS RSM, ERDMANN W. Verapamil and reversal of vecuronium neuromuscular blockade. **Anesth Analg**, 1984; 63: 155-157.

VITAL BRAZIL O. Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. **O hospital**, 1965; 68: 183-224.

WALI FA. Interaction of verapamil with gallamine and pancuronium and reversal of combined neuromuscular blockade with neostigmine and edrophonium. **Eur J Anaesthesiol**, 1986a; 3:385-393.

WALI FA. Verapamil intensifies neuromuscular blockade produced by gallamine and pancuronium at the chick neuromuscular junction. **Pharmacol Res Commun**, 1986b; 18:529-541.

WALI FA. Interactions of nifedipine and diltiazem with muscle relaxants and reversal of neuromuscular blockade with edrophonium and neostigmine. **J Pharmacol**, 1986c; 17:244-253.

WALI FA. Interaction of verapamil with d-tubocurarine and cholinergic agonists at the avian neuromuscular junction. **Acta Anaesthesiol Scand**, 1987; 31:15-20.

WALI FA, SUER AH. Effect of verapamil on Ca²⁺ influx to rat phrenic nerve-diaphragm preparation. **Br J Anaesth**, 1987; 59:1571-1578.

WALI FA, MCATEER E, SUER AH. Interaction of verapamil with atracurium and reversal of combined neuromuscular blockade with edrophonium and neostigmine. **Ir J Med Sci**, 1987; 156: 215-218.

WALSH KB, BRYANT SH, SCHWARTZ A. Effect of calcium antagonist drugs on calcium currents in mammalian skeletal muscle fibers. **J Pharmacol Exp Ther**, 1986; 236:403-407.

WANG X, ENGISCH KL, LI Y, PINTER MJ, COPE TC, RICH MM. Decreased synaptic activity shifts the calcium dependence of release at the mammalian neuromuscular junction in vivo. **J Neurosci**, 2004; 24:10687-10692.

WASTILA WB, MAEHR RB, TURNER GL, HILL DA, SAVARESE JJ. Comparative pharmacology of cisatracurium (51W89), atracurium, and five isomers in cats. **Anesthesiology**, 1996; 85: 169-177.

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.

VITAL BRAZIL O. Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. **O Hospital**. 1965; 68: 183-224.

ZALMAN F, PERLOFF JK, DURANT NN, CAMPION DS. Acute respiratory failure following intravenous verapamil in Duchenne's muscular dystrophy. ***Am Heart J***, 1983; 105: 510-511.

ZSOTER TT, HENEIN NF, WOLCHINSKY C. The effect of sodium nitroprusside on the uptake and efflux of ^{45}Ca from rabbit and rat vessels. ***Eur J Pharmacol***, 1977; 45:7-12.

Anexos

**8.1 ANEXO 1. COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - IB - UNICAMP -
PROTOCOLO Nº 898-2**

 UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia	 CEEA-IB-UNICAMP
--	--	--

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

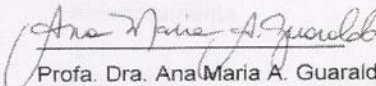
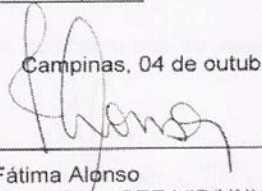
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 898-2, sobre "INFLUÊNCIA DA NIFEDIPINA SOBRE OS EFEITOS DOS BLOQUEADORES NEUROMUSCULARES NA JUNCTÃO NEUROMUSCULAR" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Angélica de Fátima Assunção Braga / Silmara Rodrigues de Sousa 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 898-2, entitled "INFLUENCE OF NIFEDIPINE ON EFFECT OF NEUROMUSCULAR BLOCKERS IN NEUROMUSCULAR JUNCTION", 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. Guarnido Presidente - CEEA/IB/UNICAMP	 Fátima Alonso Secretária - CEEA/IB/UNICAMP
--	---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE BIOLOGIA CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL	TELEFONE 55 19 3788-6359 FAX 55 19 32893124
---	--

8.2 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, medicina 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

8.3 ANEXO 3. PROCESSO EDITORIAL RBA-346/05

São Paulo, 09 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 Nifedipina no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Atracúrio e pelo Cisatracúrio. Estudo em Preparações Nervo Frênico-Diafragma de Rato”**

Prezada Dra. Angélica

Tenho a satisfação de comunicar que o artigo, em referência, foi aprovado para publicação na Rev Bras Anesthesiol, 2006;56:2 (março – abril), como **Artigo Científico**.

Antes da publicação, a firma encarregada da editoração gráfica deverá enviar-lhe cópia para sua **revisão**.

Sendo o que se apresenta para o momento, reformulo o meu apreço.

Atenciosamente

Dra. Judymara Lauzi Gozzani *Editor- Chefe*



8.4 Anexo 4. Artigo Aceito para Publicação

Influência da Nifedipina no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Atracúrio e pelo Cisatracúrio.
Estudo em Preparações Nervo Frênico-Diafragma de Rato *

The Influence of Nifedipine on Neuromuscular Blockade Produced by Atracurium and Cisatracurium.
A Study in a Phrenic Nerve-Diaphragm Preparation on the Rat

Silmara Rodrigues de Sousa ¹, Angélica de Fátima de Assunção Braga, TSA², Glória Maria Braga Potério, TSA², Franklin Sarmiento da Silva Braga ³, Yolanda Christina S Loyola ¹, Samanta Cristina Antoniassi Fernandes ¹.

1. Aluna do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da FCM da UNICAMP.
2. Professora Associada do Departamento de Anestesiologia da FCM da UNICAMP
3. Professor Doutor do Departamento de Anestesiologia da FCM da UNICAMP

* Recebido do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas (FCM – UNICAMP), Campinas, SP

Apresentado em 26 de setembro de 2005.

Aceito para publicação em 09 de Dezembro de 2005.

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

Sousa SR, Braga AFA, Poterio GMB, Braga FSS, Loyola YCS, Fernandes SCA – Influência da Nifedipina no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Atracúrio e pelo Cisatracúrio. Estudo em Preparações Nervo Frênico-Diafragma de Rato

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Os bloqueadores de canais de cálcio podem interagir com bloqueadores neuromusculares potencializando seus efeitos. Os estudos sobre esta interação mostram resultados controversos. Em alguns estudos estas drogas produziram bloqueio neuromuscular, ou contratura ou nenhum efeito sobre as respostas musculares esqueléticas foi evidenciado. O estudo avaliou em diafragma de rato, os efeitos da nifedipina sobre a resposta muscular e sua possível interação com os bloqueadores neuromusculares.

MÉTODO: Foram utilizados 25 ratos, com peso entre 250 a 300 g sacrificados sob anestesia com pentobarbital (40mg/kg) por via intraperitoneal. A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por Bulbring. O diafragma foi mantido sob tensão, ligado a um transdutor isométrico e submetido à estimulação indireta de 0,1 Hz de frequência. As contrações do diafragma foram registradas em fisiógrafo. Para avaliação dos efeitos das drogas na transmissão neuromuscular, estas foram adicionadas isoladamente ou associadas à preparação, nas seguintes concentrações: nifedipina (4 µg/mL); atracúrio (20 µg/mL); cisatracúrio (3 µg/mL). Nas preparações nervo frênico-diafragma avaliaram-se: 1) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 45 minutos após a adição da nifedipina e dos bloqueadores neuromusculares isoladamente e após a associação das drogas; 2) os efeitos da nifedipina nos potenciais de membrana (PM) e potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM).

RESULTADOS: A nifedipina empregada isoladamente não alterou a amplitude das respostas musculares, mas aumentou significativamente a atividade bloqueadora neuromuscular do atracúrio e do cisatracúrio. Não alterou o potencial de membrana, e ocasionou aumento inicial na frequência dos PPTM, seguido de bloqueio.

CONCLUSÕES: A nifedipina na concentração empregada potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e cisatracúrio. Estudos eletrofisiológicos demonstram uma ação pré-sináptica e ausência de ação despolarizante sobre a fibra muscular.

Unitermos: BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO: nifedipina; BLOQUEADORES NEUROMUSCULARES, Não-despolarizante: atracúrio, cisatracúrio.

SUMMARY

Sousa SR, Braga AFA, Poterio GMB, Braga FSS, Loyola YCS, Fernandes SCA – The Influence of Nifedipine on Neuromuscular Blockade Produced by Atracurium and Cisatracurium. A Study in a Phrenic Nerve-Diaphragm Preparation on the Rat

BACKGROUND AND OBJECTIVES: The calcium channel blocking agents may interact with neuromuscular blocking agents potentiating the effect of these drugs. There are various studies investigating this interaction but the results are still controversial. In some studies, these drugs produce neuromuscular block, or contraction or some no effect on skeletal muscle response was observed. We aimed to evaluate in the rat diaphragm the effects of nifedipine on muscle response to indirect stimulation and the possible interaction between this drug and neuromuscular blocking agents.

METHODS: Twenty five rats weighing between 250 and 300g were used for the study. These rodents were sacrificed under anesthesia with intraperitoneal pentobarbital. The preparation was mounted according to the technique described by Bulbring. The hemidiaphragm was maintained under tension, attached to an isometric force transducer and stimulated indirectly at a frequency of 0.1 Hz. The diaphragm contractions were recorded on a physiograph. To evaluate drug effects on neuromuscular transmission, these drugs were added alone or combined in the following concentrations: nifedipine (4µg/mL); atracurium (20µg/mL); cisatracurium (3µg/mL). In the rat phrenic nerve-diaphragm preparation the following aspects were assessed: 1) amplitude of diaphragm muscle response to indirect stimulation, before and 45 minutes after the addition of nifedipine and the neuromuscular blocking drug alone and after combination of drugs; 2) the effects of nifedipine on membrane potentials (MPs) and miniature end-plate potentials (MEPPs).

RESULTS: The use of nifedipine alone did not alter the amplitude of muscle response, but significantly increased the neuromuscular blocking activity of atracurium and cisatracurium. Nifedipine did not alter membrane potential, and caused an initial increase in the frequency of MEPPs, followed by blockade.

CONCLUSIONS: The nifedipine in the concentration used potentiated the neuromuscular block produced by atracurium and cisatracurium. Physiological studies demonstrated a presynaptic action and a lack of effect on membrane potential no depolarizing action on muscle fiber.

Key Words: CALCIUM CHANNEL BLOCKERS: nifedipine; NEUROMUSCULAR BLOCKERS, Nondepolarizing: atracurium, cisatracurium

INTRODUÇÃO

Os bloqueadores de canais de cálcio são amplamente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares como angina pectoris, cardiomiopatias hipertensão arterial e disritmias supraventriculares. Embora inúmeros estudos tenham sido realizados para investigar os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio nas respostas musculares e sua interação com bloqueadores neuromusculares (BNM), os resultados ainda são conflitantes. Alguns estudos mostraram que os bloqueadores de canais de cálcio produzem bloqueio neuromuscular ¹⁻⁵, outros relataram contratura muscular ⁶⁻⁷ ou mesmo nenhum efeito na musculatura esquelética foi evidenciado ⁸⁻¹⁰. É pouco provável que em doses terapêuticas os bloqueadores de Ca^{++} possam determinar bloqueio neuromuscular, mas quando a margem de segurança da transmissão neuromuscular está comprometida pelo uso de BNM ou por doenças neuromusculares, pode haver exacerbação da paralisia muscular ¹¹. Portanto trabalhos apontam para a interação entre bloqueadores de canais de cálcio e bloqueadores neuromusculares, com potencialização dos efeitos dos bloqueadores neuromusculares ^{2,4,8-10,12-14}. A nifedipina é um bloqueador de canal de cálcio, derivado da dihidropiridina, disponível somente para uso por via oral, com potente atividade vasodilatadora periférica e coronariana, e mínimo efeito nos vasos de capacitância ¹⁵.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da nifedipina na transmissão neuromuscular e a sua influência no bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e pelo cisatracúrio.

MÉTODO

O 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 25 ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 250 e 300 g sacrificados sob anestesia com pentobarbital (40 mg.kg^{-1} , por via intraperitoneal), e após 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 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 g) através de um fio ligado a um transdutor isométrico Load Cell BG50 GMS, e submetido à estimulação indireta de 0,1 Hz de frequência e duração de 0,2 mseg e as variações de tensão produzidas pelas contrações do diafragma foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400. Formaram-se grupos ($n = 5$) para avaliar os efeitos das drogas na transmissão neuromuscular, quando empregadas isoladamente: nifedipina (4 $\mu\text{g/mL}$); atracúrio (20 $\mu\text{g/mL}$); cisatracúrio (3 $\mu\text{g/mL}$). Em outros dois grupos ($n = 5$) foram estudados os efeitos das associações nifedipina aos dois bloqueadores neuromusculares (atracúrio e cisatracúrio), sobre a amplitude das respostas musculares. As respostas musculares a estimulação indireta foram registradas durante 45 minutos após a adição das drogas. Utilizou-se também a preparação nervo frênico-diafragma de rato (NFD) para o estudo dos efeitos da nifedipina 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 45 minutos após a adição de nifedipina e dos bloqueadores neuromusculares isoladamente; 2) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 45 minutos após a adição da associação nifedipina - bloqueador neuromuscular; 3) os efeitos da nifedipina sobre os potenciais de membrana (PM) e potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM). Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão. Para análise estatística foram utilizados os testes t de Student e t de Student para amostras pareadas. Assumiu-se um nível de significância de 5% ($\alpha = 5\%$). O poder do teste foi calculado e obteve-se $\beta > 20\%$ (poder $> 80\%$).

RESULTADOS

A nifedipina na concentração estudada e empregada isoladamente em preparação NFD, não causou redução na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta (Figura 1).

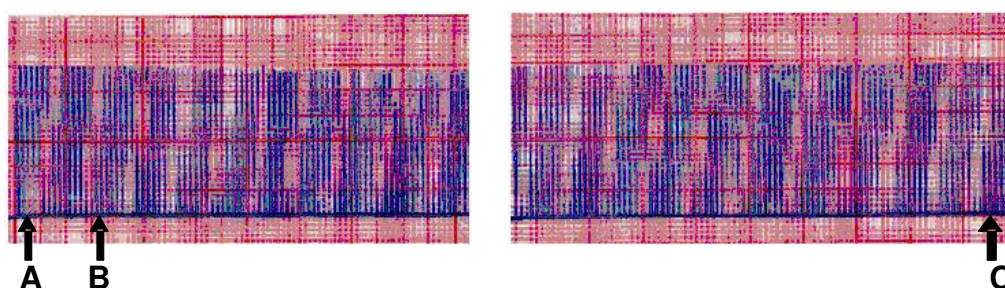


Figura 1. Efeito da Nifedipina (4 $\mu\text{g/mL}$) nas Respostas Musculares a Estimulação Indireta em Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Rato. **A:** controle; **B:** adição de nifedipina; **C:** 45 minutos após a adição de nifedipina

Nas preparações tratadas com nifedipina o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio foi de $64,19 \pm 9,37\%$, sendo significativamente maior ($p = 0,0053$) do que quando o atracúrio foi empregado

isoladamente ($45,02 \pm 6,33\%$) (Figura 2). O bloqueio produzido pela associação nifedipina:cisatracúrio foi de $74,04 \pm 10,12\%$, significativamente maior ($p = 0,0038$), do que o observado com o cisatracúrio empregado isoladamente ($48,01 \pm 10,33\%$) (Figura 3).

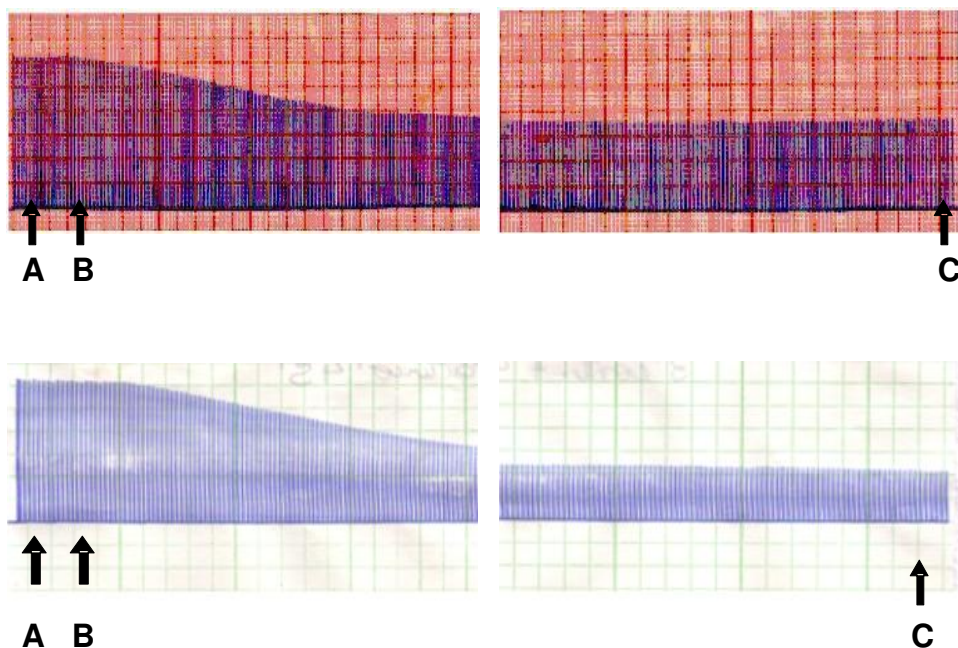


Figura 2. Efeito do atracúrio isoladamente – 20 µg/mL (**superior**) e de sua associação a nifedipina - 4µg/mL (**inferior**) nas respostas musculares a estimulação indireta em preparação nervo frênico - diafragma de rato. **A:** controle; **B:** adição do atracúrio ou associação atracúrio e nifedipina; **C:** 45 minutos após a adição do atracúrio ou associação atracúrio e nifedipina.

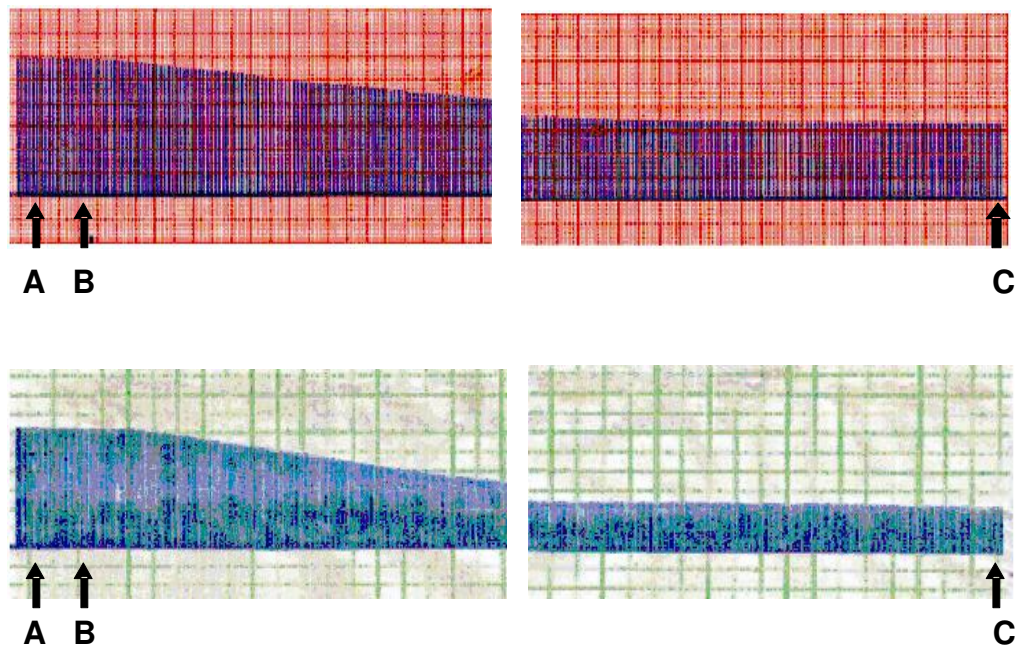


Figura 3. Efeito do cisatracúrio isoladamente - 3 μ g/mL (**superior**) e de sua associação a nifedipina 4 μ g/mL (**inferior**) nas respostas musculares a estimulação indireta em preparação nervo frênico - diafragma de rato. **A:** controle; **B:** adição do cisatracúrio ou associação cisatracúrio e nifedipina; **C:** 45 minutos após a adição do cisatracúrio ou associação cisatracúrio e nifedipina.

Não se observou efeito significativo da nifedipina sobre os potenciais de membrana. Os efeitos sobre os potenciais de placa terminal em miniatura caracterizaram-se inicialmente por um aumento na frequência, observado 30 minutos após a adição da droga, seguido de bloqueio aos 60 minutos (Figura 4).

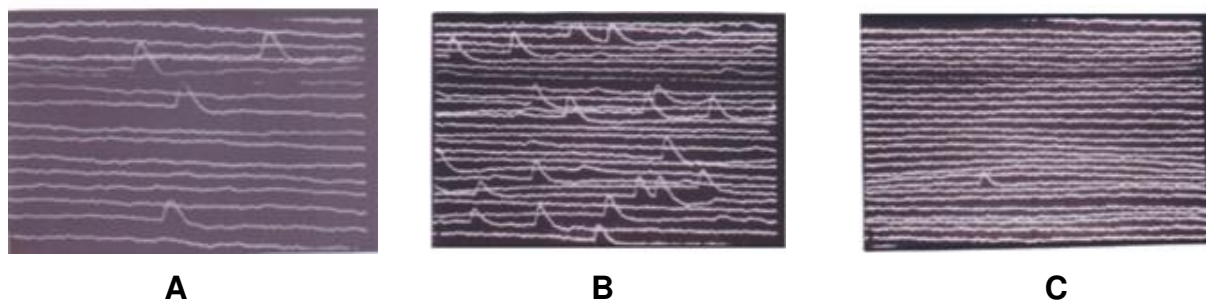


Figura 4. Efeito da nifedipina (4 μ g/mL) nos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação nervo frênico - diafragma de rato. **A:** controle; **B:** 30 minutos após a adição de nifedipina, **C:** 60 minutos após a adição de nifedipina.

DISCUSSÃO

Há evidências de que os bloqueadores de canais de cálcio podem interagir e potencializar os efeitos dos bloqueadores neuromusculares, comumente utilizados em anestesia geral ^{4,9,12,17-20}.

Estes efeitos foram demonstrados experimentalmente, em preparações isoladas, em animal intacto, e também foram confirmados na clínica, em paciente portador de distrofia muscular de Duchenne que desenvolveu quadro de insuficiência respiratória aguda após a administração de verapamil para tratamento de *flutter* atrial ^{2-4,8-14,17-18,21}, assim como pela maior dificuldade na reversão do bloqueio neuromuscular em paciente tratado cronicamente com verapamil, sendo essas intercorrências atribuídas a propriedades bloqueadora neuromuscular do verapamil ²². O emprego da preparação isolada nervo – músculo (*in vitro*), adequadamente aerada e em temperatura mantida constante, possibilita a avaliação dos efeitos da nifedipina e bloqueadores neuromusculares, nas respostas musculares a estimulação indireta, excluindo-se outros fatores que possam interferir na transmissão neuromuscular. Além disso experimentos realizados em ratos são considerados mais adequados para investigar eventos pós-sinápticos, quando comparados aos desenvolvidos em cães⁹.

Embora os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio tenham sido extensivamente investigados nos músculos cardíaco, liso vascular, respiratório e intestinal, existem poucos estudos sobre a ação destas drogas na atividade neuromuscular. O músculo esquelético contém canais de cálcio tipo lento, similar ao observado nos músculos cardíaco e liso vascular, com locais especiais de ligação para os bloqueadores de canais de cálcio. Estes canais, nos músculos liso vascular e cardíaco, encontram-se situados sobre toda a membrana muscular e são muito sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio, enquanto que no músculo esquelético são menos sensíveis e situam-se no sistema tubular transversal²³. Devido a essas particularidades alguns processos fisiológicos na junção neuromuscular ou no músculo podem ser alterados por estas drogas.

A escolha da dose dos bloqueadores neuromusculares foi estabelecida em projeto piloto, ajustando-a até a obtenção de um bloqueio neuromuscular que se instalava progressivamente durante 45 minutos. A concentração de nifedipina utilizada no estudo foi de 4µg/mL, determinada a partir de dados apresentados nos estudos de BIKHAZI et al (1988)⁹. Seu emprego isolado não produziu comprometimento da transmissão neuromuscular, resultado semelhante ao observado em outros trabalhos^{1,9}. Estes autores relataram em experimentos realizados *in vitro* e em *in vivo*, que a nifedipina e o verapamil produziram mínima ou nenhuma alteração nas respostas musculares a estímulos isolados. No entanto estes resultados são contrários aos de del Pozo e Baeyens ⁵, que estudaram em preparação nervo frênico-diafragma de rato, os efeitos de várias concentrações de nifedipina, verapamil e diltiazem, e observou diminuição concentração-dependente das respostas do músculo diafragma a estimulação indireta. Resultados similares também foram evidenciados em outros estudos experimentais utilizando outros bloqueadores de canais de cálcio ^{2-4,17}.

A semelhança de estudos anteriores, a nifedipina potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e pelo cisatracúrio. Concentrações (*in vitro*) ou doses (*in vivo*) de verapamil ou nifedipina que isoladamente apresentaram pequeno ou nenhum efeito na resposta muscular aumentaram a potência do atracúrio, vecurônio e pancurônio, evidenciado por uma diminuição da DE₅₀ destas drogas, efeito esse considerado mais que aditivo ^{1,9}.

Embora as razões para esta interação e potencialização do bloqueio neuromuscular, não estejam totalmente esclarecidas, vários mecanismos têm sido propostos. Alguns trabalhos realizados *in vivo* e *in vitro* sugerem que os bloqueadores de canais de cálcio impedem o influxo de cálcio através da membrana dos canais lentos de cálcio, alterando a concentração de cálcio e de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) pré-sináptica, prejudicando a mobilização e a liberação do neurotransmissor e conseqüentemente inibindo a transmissão neuromuscular e a contração muscular ^{3-4,14,17-19,24-27}. Estas drogas também apresentam atividade anestésica local, que pode contribuir para o efeito depressor na contração muscular, provavelmente devido sua ação no canal rápido de sódio ^{15,17,21}.

Tem sido relatado na literatura que o verapamil reduz a liberação de acetilcolina na terminação nervosa motora, sugerindo uma ação pré-sináptica ^{4,21,25}. Em outros trabalhos várias explicações têm sido propostas para os efeitos diretos do verapamil no músculo esquelético. Esta droga ao atuar em canais de cálcio no músculo esquelético, previne a entrada de cálcio nas células musculares, prejudicando o mecanismo de ativação e conseqüentemente o processo de excitação-contração ^{13,28-29}. Alternativamente, Chiarandini e Bentley ³⁰ relataram que o verapamil em preparação isolada de sapo bloqueia a resposta muscular induzida pela acetilcolina e sugere que de modo semelhante aos bloqueadores neuromusculares não-despolarizantes, pode ter um efeito sobre os canais iônicos ativados pela acetilcolina na placa terminal, refletindo um efeito pós-juncional ^{1,30}. Por outro lado os resultados sobre os efeitos inibitórios do verapamil nas respostas musculares a estimulação indireta são maiores do que em relação às obtidas com os estímulos diretos, o que pode significar que o bloqueador de canal de cálcio também atua diretamente no nervo ^{3,19}.

Na avaliação dos potenciais bioelétricos, observou-se que a nifedipina na concentração empregada não altera o potencial de membrana das fibras musculares, demonstrando, portanto que não possui ação despolarizante sobre a fibra muscular esquelética. Observou-se, no entanto influência nos potenciais de placa terminal em miniatura (ppts) o que pode ser atribuído a uma possível ação pré-sináptica.

Os anestesiológicos podem em algum momento se deparar com esta interação, quando da realização de anestesia em pacientes em uso crônico de bloqueadores de canais de cálcio ou mesmo diante da necessidade do uso destas drogas para tratamento de intercorrências cardiocirculatórias durante o ato anestésico-cirúrgico. Resultados de estudos *in vitro* com a associação de bloqueadores de canais de cálcio e bloqueadores neuromusculares, sugerem que a interação entre esses dois

grupos de drogas pode diferir de acordo com a forma de uso do bloqueador de canal de cálcio. Nos pacientes em uso crônico de antagonistas de canais de cálcio, estas drogas podem se acumular nos músculos e grande parte do bloqueio pode ser atribuído ao antagonista de cálcio. Sua administração durante a anestesia pode aumentar temporariamente o grau de bloqueio neuromuscular, sem, no entanto, prolongar sua duração⁹. Os resultados mostram que a nifedipina na concentração empregada potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e cisatracúrio. As alterações do potencial de placa terminal em miniatura exteriorizam uma ação pré-sináptica e a ausência de efeito no potencial de membrana demonstra não possuir ação despolarizante sobre a fibra muscular.

REFERÊNCIAS

01. Bikhazi GB, Flores C, Foldes FF - The effects of verapamil and EGTA on the rat phrenic nerve hemidiaphragm preparation. *Anesth Analg*, 1985; 64: 505-508.
02. Salvador A, del Pozo E, Carlos R et al - Differential effects of calcium channel blocking agents on pancuronium and suxamethonium-induced neuromuscular blockade. *Br J Anaesth*, 1988; 60:495-499.
03. Kraynack BJ, Lawson NW, Gintautas J - Neuromuscular blocking action of verapamil in cats. *Can Anaesth Soc J*, 1983;30:242-247.
04. Kraynack BJ, Lawson NW, Gintautas J et al - Effects of verapamil on indirect muscle twitch responses. *Anesth Analg*, 1983;62:827-830.
05. Del Pozo E, Baeyens JM - Effects of calcium channel blockers on neuromuscular blockade induced by aminoglycoside antibiotics. *Eur J Pharmacol*, 1986;128:49-54.
06. Bondi AY - Effects of verapamil on excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 1978;205:49-57.
07. Sato T, Ono H - Demonstration of slow channel activation in skeletal muscle of the dog. *Eur J Pharmacol*, 1982;83:177-181.
08. Anderson KA, Marshall RJ - Interactions between calcium entry blockers and vecuronium bromide in anaesthetized cats. *Br J Anaesth*, 1985;57:775-781.
09. Bikhazi GB, Leung I, Flores C et al - Potentiation of neuromuscular blocking agents by calcium channel blockers in rats. *Anesth Analg*, 1988; 67:1-8.
10. Durant NN, Nguyen N, Katz RL - Potentiation of neuromuscular blockade by verapamil. *Anesthesiology*, 1984;60:298-303.
11. Zalman F, Perloff JK, Durant NN et al - Acute respiratory failure following intravenous verapamil in Duchenne's muscular dystrophy. *Am Heart J*, 1983;105:510-511.
12. Ilias W, Steinbereithner K - Potentiation of pancuronium induced neuromuscular blockade by calcium channel blockers in vitro. *J Neural Transm*, 1985;64:285-293.
13. Carpenter RL, Mulroy MF - Edrophonium antagonize combined lidocaine-pacuronium and verapamil-pancuronium neuromuscular blockade in cats. *Anesthesiology*, 1986; 65:506-510.
14. Lawson NW, Kraynack BJ, Gintautas J - Neuromuscular and electrocardiographic responses to verapamil in dogs. *Anesth Analg*, 1983;62:50-54.
15. Reves JG, Kissin I, Lell WA et al - Calcium entry blockers: uses and implications for anesthesiologists. *Anesthesiology*, 1982; 57: 504-518.
16. Bulbring E. Observation on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol*, 1946; 1:38-61.
17. Sekerci S, Tulunay M - Interactions of calcium channel blockers with non-depolarising muscle relaxants in vitro. *Anaesthesia*, 1996;51:140-144.

18. Wali FA - Interaction of verapamil with d-tubocurarine and cholinergic agonists at the avian neuromuscular junction. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1987;31:15-20.
19. Wali FA - Verapamil intensifies neuromuscular blockade produced by gallamine and pancuronium at the chick neuromuscular junction. *Pharmacol Res Commun*, 1986;18:529-541.
20. Wali FA - Interaction of verapamil with gallamine and pancuronium and reversal of combined neuromuscular blockade with neostigmine and edrophonium. *Eur J Anaesthesiol*, 1986;3:385-393.
21. Jones RM, Cashman JN, Casson WR et al - Verapamil potentiation of neuromuscular blockade: failure of reversal with neostigmine but prompt reversal with edrophonium. *Anesth Analg*, 1985;64:1021-1025.
22. van Poorten JF, Dhasmana KM, Kuypers RS et al - Verapamil and reversal of vecuronium neuromuscular blockade. *Anesth Analg*, 1984;63:155-157.
23. Nayler WG - Tissue-selectivity. In: Nayler WG - *Calcium antagonists*, 2nd. London: Harcourt Brace Jovanovich Publishers, 1989: 113-129.
24. Ribeiro JA, Dominguez ML, Goncalves MJ – Purine effects at the neuromuscular junction and their modification by theophylline, imidazole and verapamil. *Archives Internationales Pharmacodynamie et de Therapie* 1979; 238:206-219.
25. Standaert FG, Dretchen KL - Cyclic nucleotides in neuromuscular transmission. *Anesth Analg*, 1981;60:91-99.
26. Singh BN, Ellrodt G, Peter CT - Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs*, 1978;15:169-97.
27. Esau SA - Interaction of theophylline, verapamil, and diltiazem on hamster diaphragm muscle force in vitro. *Am J Physiol*, 1988;254:C365-371.
28. Donaldson PL, Beam KG - Calcium currents in a fast-twitch skeletal muscle of the rat. *J Gen Physiol*, 1983;82:449-468.
29. Walsh KB, Bryant SH, Schwartz A - Effect of calcium antagonist drugs on calcium currents in mammalian skeletal muscle fibers. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986;236:403-407.
30. Chiarandini DJ, Bentley PJ - The effects of verapamil on metabolism and contractility of the toad skeletal muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 1973;186:52-59.

8.5 ANEXO 5. TABELAS

Tabela 2. Valores individuais, médias e desvios padrão dos percentuais de redução (%) das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta após 45 minutos da adição de d-tubocurarina e da associação d-tubocurarina - nifedipina

Experimento	Droga		p
	d-tubocurarina (0,5µg.ml)	d-tubocurarina (0,5µg.ml) + nifedipina (4µg.ml)	
01	36,6	43,3	
02	36,6	36,7	
03	39,3	33,3	
04	43,3	36,7	
05	50,0	33,3	
Média ± DP	41,16 ± 5,65	36,7 ± 4,08	0,1869

Teste t de Student

Tabela 3. Valores individuais, médias e desvios padrão dos percentuais de redução (%) das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta após 45 minutos da adição de atracúrio e da associação atracúrio - nifedipina

Experimento	Droga		p
	atracúrio (20µg.ml)	atracúrio (20µg.ml) + nifedipina (4µg.ml)	
01	40,0	64,5	
02	45,2	61,3	
03	40,0	73,3	
04	55,5	71,9	
05	44,4	50,0	
Média ± DP	45,02 ± 6,33	64,19 ± 9,37	0,0053

Teste t de Student

Tabela 4. Valores individuais, médias e desvios padrão dos percentuais de redução (%) das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta após 45 minutos da adição de cisatracúrio e da associação cisatracúrio - nifedipina

Experimento	Droga		p
	cisatracúrio (3µg.ml)	cisatracúrio (3µg.ml) + nifedipina (4µg.ml)	
01	58,3	83,3	
02	44,8	83,3	
03	51,9	63,3	
04	31,7	76,9	
05	53,3	63,3	
Média ± DP	48,01 ± 10,33	74,04 ± 10,12	0,0038

Teste t de Student

Tabela 5. Valores individuais, médias e desvios-padrão da altura (cm) das respostas a acetilcolina (20µg/ml), em preparação *Biventer cervicis* de Pintainho antes e após 30 minutos da adição da nifedipina (4µg/ml)

Experimentos n=4	antes da nifedipina	30` após a nifedipina	p
1	2,0	2,3	
2	1,1	1,2	
3	1,4	1,0	
4	2,5	2,5	
X ± DP	1,75 ± 0,62	1,75 ± 0,75	0,8819

Teste t de Student pareado

Tabela 6. Valores individuais, médias e desvios-padrão da altura (cm) das respostas a acetilcolina (20µg/ml), em preparação diafragma de rato cronicamente desnervado antes e após 30 minutos da adição da nifedipina (4µg/ml)

Experimentos n=4	Antes da nifedipina	30` após a nifedipina	p
1	1,3	0,8	
2	1,1	1,1	
3	0,3	0,4	
4	0,4	0,4	
X ± DP	0,77 ± 0,49	0,67 ± 0,34	0,5137

Teste t de Student pareado