

VANESSA HENRIQUES CARVALHO

**EFEITOS DOS ANESTÉSICOS LOCAIS NA TRANSMISSÃO
NEUROMUSCULAR E NO BLOQUEIO PRODUZIDO PELO
ROCURÔNIO. ESTUDO EXPERIMENTAL**

CAMPINAS

Unicamp

2008

VANESSA HENRIQUES CARVALHO

**EFEITOS DOS ANESTÉSICOS LOCAIS NA TRANSMISSÃO
NEUROMUSCULAR E NO BLOQUEIO PRODUZIDO PELO
ROCURÔNIO. 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, área de Concentração Farmacologia.

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

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Franklin Sarmiento da Silva Braga

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

C253e Carvalho, Vanessa Henriques
 Efeitos dos anestésicos locais na transmissão neuromuscular e no
 bloqueio produzido pelo rocurônio. Estudo experimental / Vanessa
 Henriques Carvalho. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Angélica de Fátima de Assunção Braga, Franklin
Sarmiento da Silva Braga

Dissertação(Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Anestésicos locais. 2. Bloqueadores neuromusculares. 3.
Junção neuromuscular. I. Braga, Angélica de Fátima de Assunção.
II. Braga, Franklin Sarmiento da Silva. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : The effects of local anesthetics on the neuromuscular
transmission and on the blockade produced by rocuronium. Experimental
study**

Keywords: • Anesthetics, local
 • Neuromuscular blockers
 • Neuromucular junction

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Profa. Dra. Rosa Inês da Costa Pereira

Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros

Data da defesa: 16-01-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Vanessa Henriques Carvalho

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Angelica De Fátima De Assuncao Braga

Co-Orientador: Prof. Dr. Franklin Sarmiento da Silva Braga

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Guilherme Antonio Moreira de Barros	
Professor (a) Doutor (a) Rosa Ines Costa Pereira	
Professor (a) Doutor (a) Angelica De Fátima De Assuncao Braga	

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 16/01/2009

DEDICATÓRIA

Deus:

Obrigada por estar comigo em todos os momentos.

Minhas grandes paixões:

meus filhos Rafael e Leonardo,

meu esposo Paulo.

Vocês são viscerais e cerebrais, essenciais à minha
saúde mental e espiritual. Amo vocês.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

À incomensurável mulher e mestra:

Profa Dra Angélica de Fátima de Assunção Braga.

Sem a sua imprescindível orientação, nada disto seria possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Henrique e Eliete e ao meu irmão Luciano pelo eterno incentivo, apoio e dedicação.

Aos queridos vovôs: Zeca e Henriques e às vovós Leny e Rosalina pelas bênçãos que vieram do céu.

Ao Professor Dr. Franklin Sarmiento da Silva Braga por sempre acreditar no meu potencial.

Aos professores: Dr. Edson Antunes, Dra. Daniele Ribeiro de Araújo e Dra. Rosa Inês Costa Pereira, pelas sugestões importantes no meu exame de qualificação.

`A Sirlei Sian Moraes pela orientação na análise estatística.

`A Professora Dra. Lea Rodrigues Simioni pela importante ajuda na pesquisa.

Aos técnicos e amigos Toninho e Gildo pela grande colaboração na parte experimental, ajuda e paciência. Minha eterna gratidão.

Ao secretário Wanderley pela colaboração.

A toda a minha família e amigos que sempre acreditaram em mim.

*“Honrar um pensador não é elogiá-lo, nem mesmo
interpretá-lo, mas discutir sua obra, mantendo-o,
dessa forma, vivo, e demonstrando,
em ato, que ele desafia o tempo e
mantém sua relevância”*

(Cornelius Castoriadis)

	PÁG.
RESUMO	<i>xli</i>
ABSTRACT	<i>xlv</i>
1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	49
2- OBJETIVOS	61
2.1- Geral	63
2.2- Específicos	63
3- MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1- Animais utilizados	67
3.2- Fármacos e concentrações utilizadas	67
3.3- Estudos Biológicos	68
3.3.1- Preparação nervo frênico – hemidiafragma de rato.....	68
3.3.2- Influência dos anestésicos locais: lidocaína, bupivacaína racêmica, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) na transmissão neuromuscular e no bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio.....	69
3.3.3- Influência dos anestésicos locais: lidocaína, bupivacaína racêmica e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) sobre a ação contraturante da acetilcolina - Preparação músculo biventer cervicis de pintainho.....	70
3.4- Estudos Eletrofisiológicos	71
3.4.1- Montagem da Preparação e Confecção dos Microeletrodos (Me).....	71

3.4.2- Descrição do circuito.....	72
3.4.3- Influência dos anestésicos locais: lidocaína, bupivacaína racêmica e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) nos Potenciais de Membrana (PM).....	74
3.4.4- Influência dos anestésicos locais: lidocaína, bupivacaína racêmica e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) nos Potenciais de placa terminal em miniatura (PPTMs).....	74
3.5- Análise Estatística.....	75
4- RESULTADOS.....	77
4.1- Estudos Biológicos.....	79
4.1.1- Efeitos dos Anestésicos Locais (lidocaína, bupivacaína racêmica - S50-R50, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) e do rocurônio nas respostas musculares em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato.....	79
4.1.2- Influência dos Anestésicos Locais (lidocaína, bupivacaína racêmica (S50-R50), mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) no bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato.....	81
4.1.3- Efeito dos Anestésicos Locais (lidocaína, bupivacaína racêmica (S50-R50), mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) na ação contraturante da acetilcolina (5µg/mL). Preparação biventer cervicis de pintainho.....	85

4.2- Estudos Eletrofisiológicos.....	90
4.2.1- Efeito dos Anestésicos Locais (lidocaína, bupivacaína racêmica (S50-R50), mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) nos Potenciais de Membrana (PM).....	90
4.2.2- Efeito dos Anestésicos Locais (lidocaína, bupivacaína racêmica (S50-R50), mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) nos Potenciais de Placa Terminal em Miniatura (PPTM).....	95
5- DISCUSSÃO.....	99
6- CONCLUSÕES.....	111
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
8- ANEXOS.....	129
Anexo 1- Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA - IB-UNICAMP - Protocolo nº 1204-1.....	131
Anexo 2- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.....	132
Anexo 3- Processo Editorial.....	134
Anexo 4- Tabelas.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
°C	Graus Celsius
DP	Desvio padrão
g	grama
Hz	Hertz
Kg	kilograma
M	molar
Me	microeletrodo
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
min	minutos
ms	milisegundos
mV	milivolts
µg	micrograma
n	número de experimentos
pptm	potencial de placa terminal em miniatura
v	volts
X	médias
NFD	nervo frênico diafragma
DL	dose letal

	PÁG.
Tabela 1- Valores médios e desvios padrão do bloqueio (%) produzido pelo rocurônio (4 µg/mL) em preparação nervo frênico diafragma de rato, previamente exposta a lidocaína (20µg/mL), bupivacaína racêmica (5µg/mL) e a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL).....	84
Tabela 2- Valores médios e desvios padrão da amplitude e do percentual de redução da resposta contraturante a acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer cervicis de pintainho, após a adição de lidocaína (20µg/mL), bupivacaína racêmica (5µg/mL), e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL).....	90
Tabela 3- Valores médios e desvios padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de diafragma de rato expostas a lidocaína (20µg/mL).....	91
Tabela 4- Valores médios e desvios padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de diafragma de rato expostas a bupivacaína racêmica (5µg/mL).....	92
Tabela 5- Valores médios e desvios padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de diafragma de rato expostas a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL).....	93

Tabela 6-	Valores individuais, médias e desvios padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico diafragma de rato, causada pelo rocurônio isoladamente (4 µg/mL) e pelo rocurônio (4µg/mL) em preparação previamente exposta a lidocaína (20 µg/mL).....	135
Tabela 7-	Valores individuais, médias e desvios padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico diafragma de rato, causada pelo rocurônio isoladamente (4 µg/mL) e pelo rocurônio (4 µg/mL) em preparação previamente exposta a bupivacaína racêmica (S50-R50) - (5µg/mL).....	136
Tabela 8-	Valores individuais, médias e desvios padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico diafragma de rato, causada pelo rocurônio isoladamente (4 µg/mL) e pelo rocurônio (4 µg/mL) em preparação previamente exposta a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5µg/mL).....	137
Tabela 9-	Valores individuais, médias, desvios padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta causada pela Acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer cervicis de pintainho, antes e após a adição de lidocaína (20µg/mL)....	138
Tabela 10-	Valores individuais, médias, desvios padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta causada pela Acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer cervicis de pintainho, antes e após a adição de bupivacaína racêmica (S50-R50) - (5µg/mL).....	139

Tabela 11- Valores individuais, médias, desvios padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta causada pela Acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer cervicis de pintainho, antes e após a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5µg/mL).....	140
--	-----

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Estrutura molecular dos Anestésicos Locais.....	52
Figura 2- Estrutura molecular da lidocaína.....	53
Figura 3- Estrutura molecular da bupivacaína racêmica.....	54
Figura 4- Estrutura molecular da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25).....	56
Figura 5- Fórmula estrutural do rocurônio.....	58
Figura 6- Esquema da preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato.....	69
Figura 7- Microeletrodo e montagem de aparelhagem para os experimentos eletrofisiológicos.....	73
Figura 8- Efeito da lidocaína (20µg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparações nervo frênico-diafragma de rato (n=5). A: adição de lidocaína; B: 60 minutos após a adição de lidocaína.....	79
Figura 9- Efeito da bupivacaína racêmica - (5µg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparações nervo frênico-diafragma de rato (n=5). A: adição de bupivacaína racêmica; B: 60 minutos após a adição de bupivacaína racêmica	80

- Figura 10-** Efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparações nervo frênico-diafragma de rato (n=5). A: adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína; B: 60 minutos após a adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína..... 80
- Figura 11-** Efeito do rocurônio (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). A: adição de rocurônio; B: 60 minutos após a adição de rocurônio..... 81
- Figura 12-** Efeito do rocurônio (4µg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), nas preparações nervo frênico-diafragma de rato (n=5), previamente expostas à lidocaína (20µg/mL). A: adição de lidocaína; B: adição de rocurônio, 30 minutos após a lidocaína; C: 60 minutos após adição de rocurônio..... 82
- Figura 13-** Efeito do rocurônio (4µg/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-diafragma de rato (n=5), previamente expostas a bupivacaína racêmica (5µg/mL). A: adição de bupivacaína racêmica; B: adição de rocurônio, 30 minutos após a bupivacaína racêmica; C: 26,8 minutos após adição de rocurônio; D: 60 minutos após adição de rocurônio..... 82

Figura 14- Efeito do rocurônio (4 μ g/mL) nas respostas musculares a estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2ms), em preparações nervo frênico-diafragma de rato (n=5), previamente expostas a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5 μ g/mL). A: adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína; B: adição de rocurônio, 30 minutos após a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína; C: 24,0 minutos após adição de rocurônio; D: 60 minutos após adição de rocurônio..... 83

Figura 15- Registro miográfico do efeito da lidocaína (20 μ g/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5 μ g/mL) em preparação biventer-cervicis de pintainho (n=7), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração 0,2ms). A: controle; B: adição de acetilcolina; C: 30 minutos após a adição de lidocaína; D: adição de acetilcolina..... 85

Figura 16- Registro miográfico do efeito da bupivacaína racêmica (5 μ g/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5 μ g/mL) em preparação biventer-cervicis de pintainho (n=7), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração 0,2ms). A: controle; B: adição de acetilcolina; C: 30 minutos após a adição de bupivacaína racêmica; D: adição de acetilcolina..... 87

- Figura 17-** Registro miográfico do efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5 µg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer-cervicis de pintainho (n=7), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração 0,2ms). A: controle; B: adição de acetilcolina; C: 30 minutos após a adição da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína; D: adição de acetilcolina..... 88
- Figura 18-** Efeito da lidocaína (20µg/mL) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação diafragma de rato. A: antes da adição de lidocaína (controle); B: 30 minutos após a adição de lidocaína; C: 60 minutos após a adição de lidocaína..... 95
- Figura 19-** Efeito da bupivacaína racêmica (5µg/mL) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação diafragma de rato. A: antes da adição de bupivacaína racêmica (controle); B: 30 minutos após a adição de bupivacaína racêmica; C: 60 minutos após a adição de bupivacaína racêmica..... 96
- Figura 20-** Efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação diafragma de rato. A: antes da adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (controle); B: 30 minutos após a adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína; C: 60 minutos após a adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína..... 97

	PÁG.
Gráfico 1- Amplitude das respostas musculares em preparações nervo frênico-diafragma de rato (n=5), expostas aos anestésicos locais e rocurônio isoladamente, e ao rocurônio em preparação previamente exposta aos anestésicos locais.....	84
Gráfico 2- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer-cervicis de pintainho, antes e 30 minutos após a lidocaína (20µg/mL).....	86
Gráfico 3- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer-cervicis de pintainho, antes e 30 minutos após a bupivacaína racêmica (5µg/mL).....	87
Gráfico 4- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer-cervicis de pintainho, antes e 30 minutos após a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL).....	89
Gráfico 5- Efeito da lidocaína (20 µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa à média ± desvio padrão de três experimentos.....	91
Gráfico 6- Efeito da bupivacaína racêmica (5 µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa à média ± desvio padrão de três experimentos.....	92

Gráfico 7-	Efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5 µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa à média ± desvio padrão de três experimentos.....	93
Gráfico 8-	Efeito da lidocaina (20µg/mL), bupivacaína racêmica (S50-R50) - (5,0µg/mL) e bupivacaína com excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) - (5,0µg/mL), no potencial de membrana nas fibras musculares de diafragma de rato. Valores médios e desvios padrão.....	94

RESUMO

Os anestésicos locais podem interagir com os bloqueadores neuromusculares e modificar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, no entanto o mecanismo dessa interação é controverso. Este estudo experimental, realizado em preparação nervo frênico – diafragma de ratos e musculo *biventer cervicis* de pintainhos, teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes anestésicos locais na transmissão neuromuscular e sua influência no bloqueio produzido pelo rocurônio. Foram avaliados os seguintes parâmetros: efeito dos anestésicos locais (lidocaína, bupivacaína racêmica, mistura em excesso enantiomérico de bupivacaína) e do rocurônio empregados isoladamente, na transmissão neuromuscular; o bloqueio produzido pelo rocurônio em preparações expostas aos anestésicos locais; a ação dos anestésicos locais na resposta contraturante da acetilcolina; seus efeitos nos potenciais de membrana e nos potenciais de placa terminal em miniatura. Os resultados foram expressos em médias e desvios padrão e analisados através dos testes t de Student, Mann-Whitney , Wilcoxon, Kruskal-Wallis e Anova com teste para comparação múltipla de Tukey. Adotou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Nas preparações nervo frênico -diafragma de rato, os anestésicos locais nas concentrações empregadas, não alteraram a amplitude das respostas musculares mas, potencializaram o efeito do rocurônio. Nas preparações *biventer cervicis* de pintainho os anestésicos locais promoveram diminuição na resposta contraturante da acetilcolina evidenciando um efeito pós-juncional. Não causaram alteração significativa nos potenciais de membrana, não demonstrando ação despolarizante na fibra muscular. A lidocaína promoveu um aumento inicial dos potenciais de placa terminal em miniatura (pptm) seguida de bloqueio e, a bupivacaína nas duas formulações causou diminuição na amplitude e na frequência dos pptm, caracterizando um efeito pré-juncional. Os resultados obtidos neste estudo demonstram um sinergismo entre as drogas comprovado por efeitos pré e pós-juncionais.

ABSTRACT

Local anesthetics can interact with neuromuscular blockers and modify their pharmacokinetics and pharmacodynamics properties but this mechanism of interaction is very controversial. This experimental study performed in rat phrenic nerve diaphragm preparation and chick biventer cervicis muscle, had the objective to evaluate the effect of different local anesthetics in neuromuscular transmission and their influence in the block promoted by rocuronium. The parameters evaluated were that: the effect of local anesthetics (lidocaine, racemic bupivacaine, enantiomeric mixture of bupivacaine) and the rocuronium isolated in neuromuscular transmission; the block promoted by rocuronium in local anesthetics exposed preparations; the action of local anesthetics in contracture response of acetylcholine; their effects in membrane potentials and miniature end plate potentials. The results were expressed in average and standard deviation and analysed using T Student test, Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal-Wallis and Anova with Tukey multiple comparative test. We adopted a level of significance of 5% ($p < 0,05$). In rat phrenic nerv diaphragm preparation, local anesthetics in the concentrations employed did not caused alterations in the amplitude of muscle responses but potentialized the effect of rocuronium. In chick biventer cervicis preparations local anesthetics promoted a decrease in acetylcholine contracture response indicating a postjunctional effect. They did not cause significant alterations in membrane potential so they did not demonstrate depolarizing action in muscle fiber. Lidocaine promoted an initial increase in miniature end plate potentials (meps) followed by block and bupivacaine in the two formulations caused a decrease in the amplitude and frequency of meps, characterizing a prejunctional effect. The results obtained in this study demonstrate a synergism of the drugs confirmed by pre and postjunctional effects.

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Por definição, os anestésicos locais são substâncias capazes de impedir, de modo reversível, a condução de impulsos nas fibras nervosas. As sensações que vêm da periferia para o sistema nervoso central (aférentes) e as mensagens enviadas para a periferia por meio do sistema nervoso central (eferentes) deixam de ser conduzidas pelo nervo sob ação do anestésico local, desaparecendo as diversas formas de sensibilidade e a atividade motora da área em que se distribui o nervo ou grupo de nervos bloqueados (CATTERALL e MACKIE, 1996; ALVES e GUANAIS, 2002).

O mecanismo de ação dos anestésicos locais relaciona-se ao bloqueio dos potenciais de ação responsáveis pela condução nervosa reduzindo, ou impedindo o grande e transitório aumento na permeabilidade das membranas excitáveis ao Na^+ , sobretudo os canais de Na^+ voltagem dependentes (CATTERALL e MACKIE, 1996; JACOB, 1998). Atualmente, aceita-se que o principal mecanismo de ação desses fármacos envolve sua interação com um ou mais locais de ligação específicos dentro do canal de sódio e duas teorias podem explicar o mecanismo de interferência na permeabilidade da membrana. A teoria do receptor específico postula que o anestésico local desloca o cálcio de um local próximo ao canal de Na^+ e, a seguir, bloqueia o canal de Na^+ adjacente. Outra teoria, a da expansão da membrana, sugere que os anestésicos locais, em virtude de suas propriedades lipofílicas, incorporam-se à membrana celular, impedindo a abertura dos poros e, portanto, interferindo na passagem de eletrólitos (JACOB, 1998; ALVES e GUANAIS, 2002).

O equilíbrio das formas básicas e catiônicas em que se apresentam os anestésicos locais está na dependência da constante de dissociação (pK_a) de cada anestésico e do pH do meio, sendo a forma catiônica a de maior importância para estabelecer o bloqueio dos canais de Na^+ , e a maior disponibilidade desta forma, é dependente do pH do interior da fibra nervosa. A forma catiônica desloca os íons Ca^{++} dos sítios receptores lipoprotéicos, localizados na superfície interna da membrana celular, bloqueando os canais de sódio, decrescendo a permeabilidade a estes íons e inibindo a despolarização da membrana

(BRAZ et al, 1983; RUBIN, 1994; JACOB, 1998; ALVES e GUANAIS, 2002; STOELTING e HILLIER, 2006)

Do ponto de vista estrutural, todos os anestésicos locais consistem num grupo amino-hidrofílico ligado através de um grupo conector éster ou amida a um resíduo aromático lipofílico - **Figura 1**. A maioria dos anestésicos locais se apresentam na forma de aminas terciárias (raramente secundárias) e situam-se em duas categorias: amino-ésteres (procaína) ou amino-amidas (lidocaína, bupivacaína, ropivacaína, mistura enântiomérica de bupivacaína). São bases fracas, pouco solúveis em água, estando disponíveis para o uso como solução de sal ácida, que é altamente hidrossolúvel e estável (BIANCONI, 1998; JACOB, 1998; ALVES e GUANAIS, 2002; STOELTING e HILLIER, 2006).

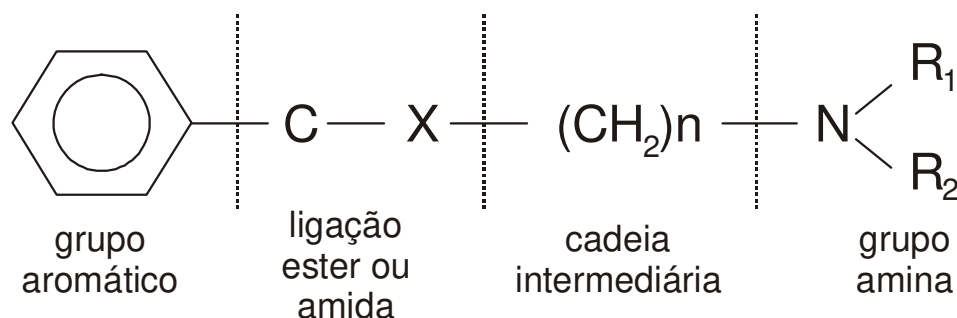


Figura 1- Estrutura molecular dos Anestésicos Locais

A cocaína, éster do ácido benzóico, foi o primeiro anestésico local introduzido na prática clínica, usado inicialmente por via tópica em oftalmologia e posteriormente em bloqueios periféricos e anestesia espinhal. Apesar de representar um grande avanço na clínica cirúrgica, seu uso estava associado a toxicidade sistêmica e dependência o que resultou em grande esforço para a síntese de substâncias químicas com propriedades anestésicas e índice terapêutico favorável. Até meados do século vinte, a maioria dos anestésicos locais eram amino-ésteres derivados do ácido benzóico, com a desvantagem de produzir reações alérgicas ou sensibilização (COVINO e VASSALO, 1985; STOELTING e HILLIER, 2006).

A grande descoberta na química dos anestésicos locais aconteceu em 1943, com a síntese da lidocaína por Löfgren (**Figura 2**). Consiste em uma amida derivada do ácido dietilaminoacético que tem como grande vantagem a ausência ou mínima propriedade de causar reações de sensibilidade. Comparada à procaína, a lidocaína tem efeito mais intenso, início mais rápido, maior duração de ação, com potência e toxicidade duas vezes maiores (COVINO e VASSALO, 1985; STRICHARTZ e COVINO, 1993; MORGAN e MIKHAIL, 2003).

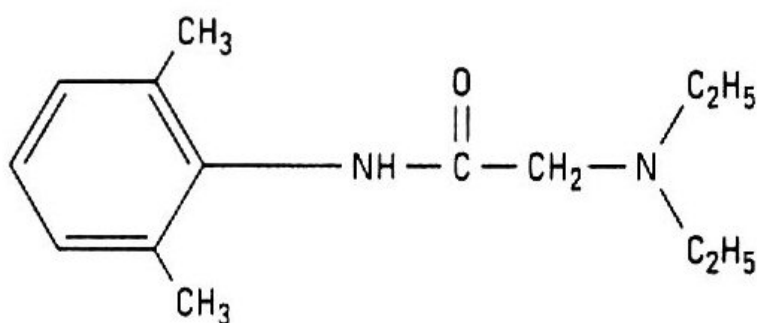


Figura 2- Estrutura molecular da lidocaína

Estudos sobre o perfil farmacológico e a eficácia dos anestésicos locais do grupo amino-amida, com exceção da lidocaína (sem carbono assimétrico), exibem resultados muito promissores em função da sua quiralidade, sobretudo por agirem no organismo a partir de uma afinidade preferencial e seletiva aos receptores do canal de sódio, propiciando diferenças nos graus de cardiotoxicidade e neurotoxicidade entre as formas levóginas, dextróginas e racêmicas (WULF, 1997; SIMONETTI et al, 1998).

Em 1957, pesquisadores sintetizaram uma série homóloga de composto com substituições N-alquílicas (metil, propil e butil) na estrutura pipecolil xilidida. Quando a substituição ocorreu com a introdução do radical butil, o composto resultante foi o N-butil pipecolil-xilidida ou butil PPX (bupivacaína) – **Figura 3** (EKËNSTRAM et al, 1957). A bupivacaína é comercializada como mistura

racêmica, contendo 2 isômeros ópticos: o enântiômero R (+) e o enântiômero S (-), com diferentes efeitos farmacológicos e toxicológicos.

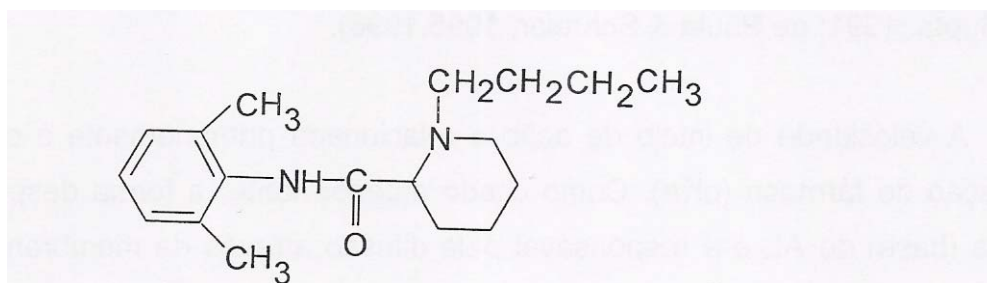


Figura 3- Estrutura molecular da bupivacaína racêmica

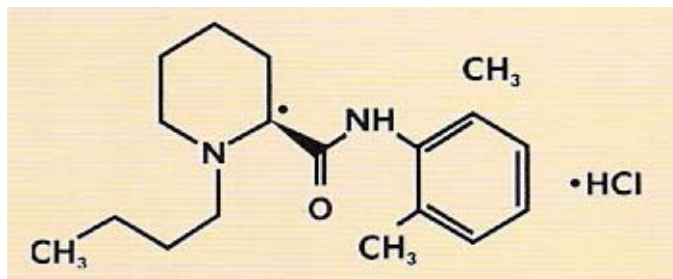
A existência de dois isômeros ópticos, ou enantiômeros, resulta da configuração da fórmula estrutural. O composto butil pipercolil xilidida contém um carbono assimétrico ou quiral (do grego, mão) ao qual se ligam grupos de átomos formando isômeros ópticos que são imagens de espelho em 3 dimensões, com forma de uma “mão direita” ou de “mão esquerda” e que não se superpõem (SIMONETTI, 1995). A comparação dos enantiômeros quanto à potência e à duração da analgesia, mostrou que o isômero S (-) da bupivacaína se equivale ou até supera o isômero R (+) (APS e REYNOLDS, 1978).

Estudos realizados em animais mostraram ser a DL50 do isômero R (+), significativamente menor do que a do isômero S (-), concluindo ter o isômero R (+) maior cardio e neurotoxicidade (ABERG, 1972; SIMONETTI, 1997a; TRACHEZ et al, 2005). Esta diferença foi confirmada, com base em resultados de estudos eletrofisiológicos que demonstraram a estereoseletividade dos enantiômeros da bupivacaína para os sítios de ligação dos canais rápidos de sódio. O enantiômero R (+) bupivacaína se liga mais firmemente ao canal de sódio e se dissocia deste mais lentamente do que o enantiômero S (-), além de deprimir mais intensamente a Vmax e induzir um bloqueio frequência-dependente bastante pronunciado (CLARKSON e HONDEGHEM, 1985; VANHOUTTE et al, 1991; LEE-SON et al, 1992; SIMONETTI, 1997a; SIMONETTI, 1997b). Além disso, o

enantiômero S (-), apresenta menor potência para bloqueio motor do que a mistura RS (+/-) de bupivacaína (TRACHEZ et al, 2005). Em relação à lidocaína, trabalhos realizados *in vitro*, mostraram que a bupivacaína apresenta maiores lipossolubilidade, permeabilidade tissular e afinidade pelos canais de sódio, características farmacocinéticas que lhe conferem maior potência anestésica, produzindo bloqueio nervoso em concentrações significativamente menores do que as observadas para a lidocaína (YANO et al, 2006).

No entanto foi a maior cardiotoxicidade apresentada pela bupivacaína que motivou a busca por um anestésico local que apresentasse as vantagens da bupivacaína quanto à potência e duração de ação e, com base na isomeria, o desenvolvimento de formulações alternativas oriundas da fórmula estrutural básica (GARCIA et al, 2001; MATHER e CHANG, 2001; LIGUORI et al, 2002). Atualmente existem duas alternativas relativamente seguras: a S (-) ropivacaína e a S(-) bupivacaína (levobupivacaína), mas embora apresentem maior segurança pela menor cardiotoxicidade, ambas exibem menor propriedade de produzir relaxamento muscular (DELFINO et al, 1999; GARCIA et al, 2001).

Através de tecnologia genuinamente brasileira, a manipulação enantiomérica dos componentes da bupivacaína racêmica resultou na nova formulação contendo 25% do isômero R (+) e 75% do isômero S (-) da bupivacaína (**Figura 4**), que produz anestesia comparável à formulação racêmica e sugerindo que a presença de 25% do isômero R (+) bupivacaína melhoraria o perfil anestésico da droga sem, contudo aumentar a incidência de efeitos tóxicos (GRISTWOOD et al, 1994; SIMONETTI, 1997a; SIMONETTI e FERREIRA, 1999; SIMONETTI et al, 2000; SIMONETTI, 2006).



• representa o centro quiral

Figura 4- Estrutura molecular da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25)

Adicionalmente conserva as mesmas propriedades físico-químicas da forma racêmica, particularmente lipossolubilidade e ligação proteica, favorecendo assim uma maior penetração e fixação no tecido neural. Nesse particular, a mistura enantiomérica apresenta as vantagens da bupivacaína racêmica, em termos de qualidade de bloqueio e duração de anestesia (KOPACZ et al, 2000). Em estudos realizados em ratos, empregando preparação nervo ciático - músculo gastrocnêmico, TRACHEZ et al (2005), observaram que a potência do enantiômero S (-) bupivacaína, foi aumentada quando 25% deste isômero foi substituído por 25% do isômero R (+) bupivacaína, concluindo ser a bupivacaína não racêmica (75S:25R) significativamente mais potente do que os isômeros S (-) ou o R (+), quanto à capacidade de causar bloqueio motor.

Os efeitos diretos dos anestésicos locais sobre a placa mioneural ainda são questionados e, embora existam muitos trabalhos buscando explicar tais efeitos, o mecanismo pelo qual interferem na transmissão neuromuscular permanece sem elucidação. No entanto estudos apontam para a interação dos anestésicos locais, assim como de outros fármacos usados no pré ou no intra-operatório com os bloqueadores neuromusculares, sendo observada potencialização, antagonismo ou mesmo nenhuma influência significativa nos

efeitos desses agentes (TEMPELHOFF et al, 1990; TOFT et al, 1990; TAIVAINEN et al, 1994; HAYWOOD et al, 1999; SPACEK et al, 1999; BRAGA et al, 2001; BRAGA et al, 2002; YORUKOGLU et al, 2003; CARDOSO et al, 2005; KIM et al, 2005; RICHARD et al, 2005; LOYOLA et al, 2006a; LOYOLA et al, 2006b; SOUSA et al, 2006; FERNANDES et al, 2007; MARTINS et al, 2007; BARCELOS et al, 2008; BRAGA et al, 2008).

Os bloqueadores neuromusculares (BNM) são fármacos amplamente utilizados na prática anestésica. Apresentam em sua estrutura um ou mais grupos de amônio quaternário, carregados positivamente, que se ligam 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 (HUNTER, 1995; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006).

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

O rocurônio (**Figura 5**) é um bloqueador neuromuscular aminoesteróide não despolarizante, de duração de ação intermediária, que tem como grande vantagem o rápido início de ação, característica que o diferencia dos demais bloqueadores adespolarizantes e o torna uma alternativa ao uso de succinilcolina em procedimentos de indução e intubação de seqüência rápidas (ANDREWS et al,

1999; ENGBAEK e VIBY-MOGENSEN, 1999; YORUKOGLU et al, 2003; STOELTING e HILLIER, 2006).

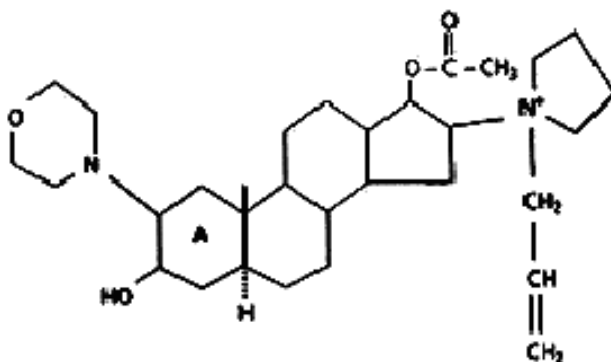


Figura 5- Fórmula estrutural do rocurônio

A interação entre os anestésicos locais e os bloqueadores neuromusculares não está completamente elucidada, e vários mecanismos podem ser responsáveis pela potencialização observada. Teoricamente estes agentes podem interferir em alguma etapa envolvida na transmissão neuromuscular.

Alguns autores descreveram que os anestésicos locais devido ao bloqueio da condução nervosa, podem interferir com a transmissão neuromuscular, não existindo evidências de que eles inibam a síntese de acetilcolina, mas em baixas concentrações reduzem a amplitude, sem alterar a frequência do potencial de placa terminal em miniatura. Assim, a influência do anestésico local sobre esses parâmetros pode indicar uma ação pré-sináptica, com conseqüente diminuição na liberação da acetilcolina ou pode diminuir a sensibilidade da membrana pós-juncional para a acetilcolina (MATTHEWS e QUILLIAM, 1964; USUBIAGA e STANDAERT, 1968; STRAUGHAN, 1971; MATSUO et al, 1978).

Adicionalmente, os anestésicos locais, além de prejudicarem a geração e propagação do potencial de ação, podem deprimir seletivamente a condução nas fibras motoras. Ainda por ação pós-sináptica, a ligação a diferentes sítios

específicos de acetilcolina, pode resultar em bloqueio das respostas contraturantes induzidas pela acetilcolina, além da possibilidade de ocluir temporariamente os canais dos receptores nicotínicos (USUBIAGA e STANDAERT, 1968; BOWMAN et al, 1970; KORDAS, 1970; NEHER e STEINBACK, 1978; COHEN et al, 1980; RUFF, 1982; SINE e TAYLOR, 1982; LOYOLA et al, 2006a; MARTINS et al, 2007)

A lidocaína pode bloquear completamente a condução nervosa e também deprimir a condução do impulso pré e pós-juncional. Em estudo que correlaciona a estrutura molecular de vários derivados da lidocaína com as suas respectivas propriedades inibitórias da transmissão neuromuscular e com a sua potência anestésica local, foi demonstrado que as propriedades moleculares desses derivados, relacionadas com o comprometimento da transmissão neuromuscular, são similares àquelas envolvidas na ativação de receptores de acetilcolina, e não com as associadas à sua potência anestésica local. Esses resultados sugerem que a lidocaína produz bloqueio neuromuscular por mecanismos distintos do seu mecanismo de ação como anestésico local (STEINBACH, 1968).

Recentemente, estudos experimentais realizados em nosso meio e utilizando preparação nervo frênico – diafragma de ratos, mostraram que a procaína, a procainamida e a lidocaína empregadas isoladamente não causaram redução na amplitude das respostas musculares à estimulação indireta, mas potencializaram o bloqueio produzido pela d-tubocurarina e pelo rocurônio (LOYOLA et al, 2006a; LOYOLA et al, 2006b; MARTINS et al, 2007).

Esses resultados vão de encontro aos de ensaios clínicos, anteriormente descritos, que mostram interação e potencialização dos efeitos dos bloqueadores pelos anestésicos locais, utilizados por diferentes vias de administração. Alguns autores estudaram a influência da bupivacaína por via peridural no bloqueio induzido pelo atracúrio e rocurônio e observaram potencialização dos efeitos dos bloqueadores neuromusculares, em relação ao observado em pacientes que não foram submetidos ao bloqueio peridural

(TOFT et al, 1990; TAIVAINEN et al, 1994). Quando da administração por via venosa, a lidocaína empregada com o objetivo de atenuar respostas reflexas da laringoscopia e intubação traqueal, ocasionou alterações na farmacodinâmica do rocurônio, evidenciadas por maior tempo de recuperação no bloqueio neuromuscular (CARDOSO et al, 2005).

Atualmente tem se tornado cada vez mais freqüente na prática clínica o emprego da associação de anestesia geral e bloqueio peridural. Apesar dos anestésicos locais comprometerem a transmissão neuromuscular somente em altas doses trabalhos mostram a possível interação destes agentes empregados por diferentes vias com os bloqueadores neuromusculares. Faz-se necessária a realização de estudos para avaliação e esclarecimento dos mecanismos que possam elucidar esta interação, visto que possibilitam o uso simultâneo e seguro destes fármacos.

2- OBJETIVOS

2.1- Geral

Avaliar os efeitos de diferentes anestésicos locais sobre a transmissão neuromuscular e a influência no bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio.

2.2- Específicos

Avaliar:

1. os efeitos da lidocaína, da bupivacaína racêmica (S50-R50) e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) sobre a transmissão neuromuscular;
2. a influência da lidocaína, da bupivacaína racêmica (S50-R50) e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio;
3. os efeitos da lidocaína, da bupivacaína racêmica (S50-R50) e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) sobre o potencial de membrana do músculo esquelético e sobre os potenciais de placa terminal em miniatura;
4. a influência da lidocaína, da bupivacaína racêmica (S50-R50) e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) sobre a ação contraturante da acetilcolina.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais utilizados

Após aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal - CEEA - IB - UNICAMP (Protocolo nº 1204-1 - Anexo 1) e seguindo-se as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - Anexo 2), foram utilizados ratos da linhagem Wistar fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp, Campinas (SP) e pintainhos da linhagem HYLINE W36, fornecidos pela granja ITO S/A, Sumaré (SP).

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

3.2- Fármacos e concentrações utilizadas

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

- Anestésicos locais:

lidocaína (20 µg/mL)

bupivacaína racêmica (S50-R50) - (5 µg/mL)

mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) - (5 µg/mL)

- Bloqueadores neuromusculares: rocurônio (4µg/mL)
- Colinérgico: acetilcolina (5 µg/mL)

3.3- Estudos Biológicos

3.3.1- Preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

Esta preparação foi utilizada para avaliar o efeito dos anestésicos locais (lidocaína, bupivacaína racêmica (S50-R50), mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) na transmissão neuromuscular e sua influência no bloqueio neuromuscular causado pelo rocurônio.

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

Foram utilizados ratos com peso entre 250 e 300g, para a retirada do hemidiafragma esquerdo e a porção do nervo frênico correspondente. Os animais foram anestesiados com uretana (1,2mg/kg, via intraperitoneal), e em seguida foram exsangüinados por secção dos vasos do pescoço, para facilitar a identificação do nervo frênico.

Foi retirado o músculo diafragma juntamente com o nervo frênico e parte das costelas (para fixação no suporte do eletrodo). O conjunto foi mergulhado em solução nutritiva de Tyrode com borbulhamento de carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e temperatura constante de 37°C. A solução nutritiva de Tyrode tem a seguinte composição em mM: NaCl- 137; NaH₂PO₄- 0,3; CaCl₂- 1,8; KCl- 2,7; glicose- 11,0; MgCl₂- 0,25; NaHCO₃- 11,9; água destilada 1000mL.

O músculo de forma triangular foi fixado por sua base em suporte apropriado, o qual permite através de eletrodos de platina estimular o nervo ou diretamente o músculo, cuja tensão é de 2,0 g/cm para registro das contrações musculares. Um eletrodo bipolar foi colocado em torno do nervo frênico para a estimulação indireta através de um estimulador GRASS modelo S88. A preparação montada com o eletrodo ficou suspensa em um suporte universal dentro de uma cuba de vidro com fundo poroso (para a aeração da solução com carbogênio) com 40mL de solução de Tyrode.

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

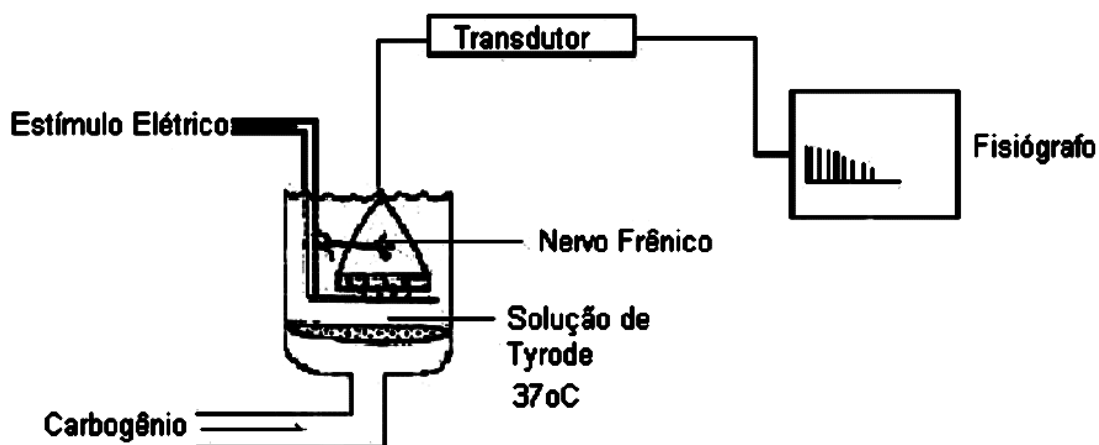


Figura 6- Esquema da preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

3.3.2- Influência dos anestésicos locais: lidocaína, bupivacaína racêmica, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) na transmissão neuromuscular e no bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio

Os experimentos (n=5) seguiram o seguinte protocolo: após a estabilização da preparação iniciou-se estimulação elétrica do nervo frênico por 3 minutos e registro da resposta controle; adição dos anestésicos locais lidocaína (20 µg/mL), bupivacaína racêmica (5 µg/mL) e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5 µg/mL); registro das respostas durante 60 minutos. O mesmo protocolo foi realizado para avaliar o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio (4µg/mL) empregado isoladamente. Foram utilizados 5 ratos diferentes para cada fármaco, ou seja, um total de 20 animais nesta etapa.

Nos experimentos (n=5) em que se estudou a associação anestésico local - bloqueador neuromuscular, o rocurônio (4µg/mL) foi adicionado à preparação após 30 minutos de exposição ao anestésico local, e as respostas registradas durante 60 minutos. Foram também utilizados 5 animais diferentes para cada anestésico local. Gerando um total de 15 experimentos. Para análise dos dados considerou-se a amplitude das respostas musculares antes e 60 minutos após a adição do bloqueador neuromuscular à preparação.

3.3.3- Influência dos anestésicos locais: lidocaína, bupivacaína racêmica e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) sobre a ação contraturante da acetilcolina - Preparação músculo *biventer cervicis* de pintainho

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

Os pintainhos foram anestesiados com halotano por via inalatória e depois se retirou o músculo *biventer cervicis*, o qual ficou suspenso em cuba de 5mL contendo a solução nutritiva de Krebs, que apresenta a seguinte composição em mM: NaCl - 136; KCl - 5; CaCl₂ - 2,5; MgSO₄ - 1,2; KH₂PO₄ - 1,2; NaHCO₃ - 23,8; glicose - 2 em água destilada 1000mL. A preparação foi aerada com borbulhamento de carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e a temperatura foi mantida em 37°C.

Foram feitos experimentos (n=7) para a detecção da curva de acetilcolina (5µg/mL) antes e depois da adição de cada anestésico local: lidocaína (20µg/mL), bupivacaína racêmica (5 µg/mL) e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5 µg/mL). Para cada anestésico local foram utilizados 7 pintainhos. Com estimulador GRASS modelo S88, aplicou-se estímulos indiretos supramaximais, com 0,1 Hz de frequência, 0,2 ms de duração

e intensidade de 4 a 9V. A tensão dada ao músculo foi de 0,5g/cm. Foi estimulado durante 3 minutos para obtenção das respostas musculares (controle); após esse período suspendeu-se a estimulação e adicionou-se na preparação a acetilcolina (5µg/mL), registrando-se a curva resposta. Quando a contratatura atingiu o seu ápice, interrompeu-se o registro do fisiógrafo e a preparação foi lavada com solução nutritiva de Krebs (três sucessivas lavagens), e os anestésicos locais lidocaína (20µg/mL), ou bupivacaína racêmica (5 µg/mL) ou mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5 µg/mL) foram adicionados separadamente à preparação e, aguardou-se 30 minutos. Após esse período foram aplicados estímulos elétricos indiretos durante três minutos para obtenção de um outro controle das respostas musculares. A seguir interrompeu-se a estimulação e adicionou-se novamente a acetilcolina (5µg/mL) registrando-se a segunda curva. O grau de contratatura à acetilcolina foi comparado antes e após a adição da lidocaína ou bupivacaína racêmica ou mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25).

As contrações foram registradas em um fisiógrafo GOULD modelo RS3400, usando-se transdutores isométricos modelo load Cell BG 50MS (Kulite Semiconductor Product Inc).

3.4- Estudos Eletrofisiológicos

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

3.4.1- Montagem da Preparação e Confeção dos Microeletrodos (Me)

O músculo diafragma depois de retirado foi estendido e fixado horizontalmente com a superfície torácica voltada para cima e fixada com alfinetes em cuba revestida de resina e silicone, preenchida com 2 mL de solução nutritiva

de Tyrode e a oxigenação da preparação feita pelo borbulhamento com carbogênio à temperatura de 37°C. Para a realização do registro de parâmetros eletrofisiológicos, a cuba foi colocada na platina do microscópio estereoscópio (Wild M7 S – Switzerland) com capacidade para aumentos de até 40 vezes.

Para a captação dos PPTMs, o microeletrodo foi implantado junto ou o mais próximo possível da região da placa motora terminal (FATT e KATZ, 1951), com auxílio de micromanipulador (Leitz). Os biopotenciais foram obtidos através de um amplificador de sinais (Getting Microelectrode Amplifier, MA, USA) e observados em osciloscópio Tektronix. Os registros dos PPTMs foram feitos em um microcomputador (Microtec, São Paulo, SP) carregado com software para aquisição de dados (AqDados, Lynx, São Paulo, SP). O computador munido de uma placa conversora A/D foi capaz de digitalizar os biopotenciais e gravá-los para posterior análise.

3.4.2- Descrição do circuito

Os microeletrodos de vidro, com resistência entre 10 - 25 M Ω , preenchidos com solução de KCl (3M), foram preparados no laboratório e conservados em geladeira. Para sua confecção, se utilizou tubos de vidro (capilares de vidro Clark que continham microcapilar interno para facilitar o preenchimento com KCl e um estirador de microeletrodo Microelectrode Puller (Palmer).

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

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

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

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

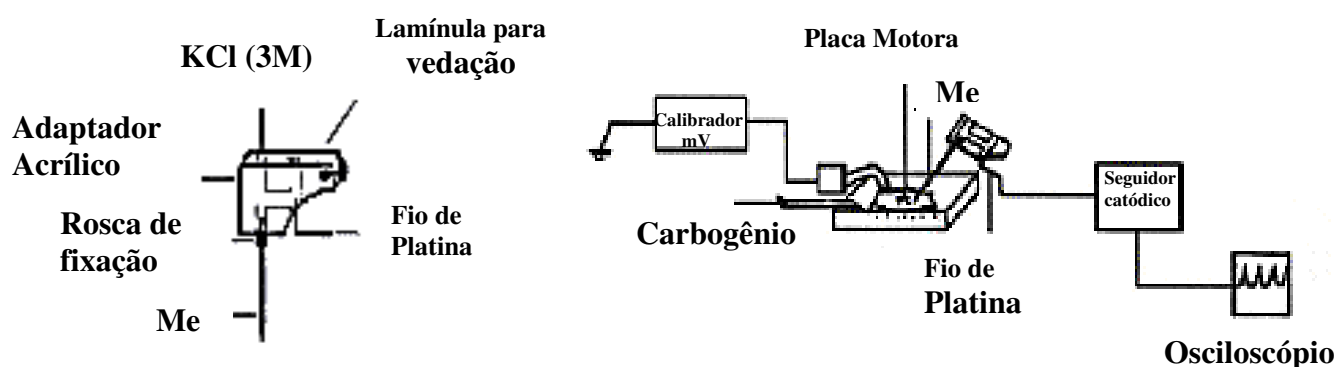


Figura 7- Microeletrodo e montagem de aparelhagem para os experimentos eletrofisiológicos

3.4.3- Influência dos anestésicos locais: lidocaína, bupivacaína racêmica e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) nos Potenciais de Membrana (PM)

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

Foram medidos cinco potenciais de membrana em cada tempo determinado, obtendo-se uma média, sendo que no tempo zero (controle), os potenciais foram medidos antes da administração dos anestésicos locais. Após esta medida, adicionou-se separadamente a lidocaína (20µg/mL), a bupivacaína racêmica (5 µg/mL) ou a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5 µg/mL) ao banho e procederam-se leituras aos 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Foram realizados três experimentos com cada anestésico local e calculou-se a média aritmética e o desvio padrão das leituras realizadas.

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

3.4.4- Influência dos anestésicos locais: lidocaína, bupivacaína racêmica e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) nos Potenciais de placa terminal em miniatura (PPTMs)

Os potenciais de placa terminal em miniatura foram avaliados em hemidiafragma esquerdo de rato, com placa motora preservada. Nos experimentos, estudaram-se os efeitos da lidocaína, da bupivacaína racêmica e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) sobre a frequência e a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura. Estes

foram registrados antes (controle), 30 e 60 minutos após a adição da lidocaína (20µg/mL), da bupivacaína racêmica (5 µg/mL) e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína(S75-R25) - (5 µg/mL).

3.5- Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como valores médios e desvios padrão. Para avaliar a redução das respostas musculares utilizaram-se os testes t de Student (distribuição normal) e Mann-Whitney; para avaliar o efeito dos anestésicos locais na resposta contraturante da acetilcolina em preparação *biventer cervicis* de pintainho utilizaram-se os testes t de Student, Wilcoxon e Kruskal-Wallis; na análise dos potenciais de membrana nas fibras musculares empregaram-se o teste de Wilcoxon para amostras pareadas, e ANOVA com teste para comparação múltipla de Tukey. Assumiu-se um nível de significância de 5% ($\alpha = 5\%$). O poder do teste foi calculado e obteve-se $\beta > 20\%$ (poder $> 80\%$). O software utilizado para análise dos dados foi o SAS versão 8.2.

4- RESULTADOS

4.1- Estudos Biológicos

4.1.1- Efeitos dos Anestésicos Locais (lidocaína, bupivacaína racêmica - S50-R50, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) e do rocurônio nas respostas musculares em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

Os anestésicos locais (lidocaína, bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) nas concentrações estudadas e empregados isoladamente, não causaram alteração significativa na amplitude das respostas musculares à estimulação elétrica indireta, em preparações nervo frênico-diafragma de ratos (**Figuras 8, 9 e 10**) e (**Gráfico 1**).

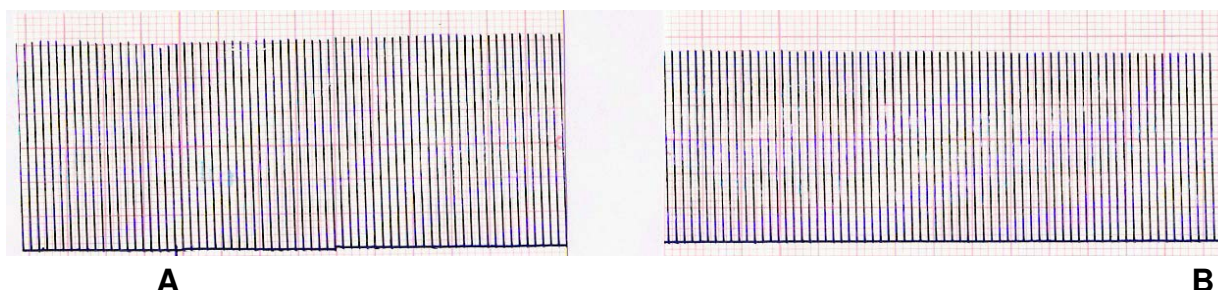


Figura 8- Efeito da lidocaína (20 μ g/mL) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparações nervo frênico-diafragma de rato (n=5). **A:** adição de lidocaína; **B:** 60 minutos após a adição de lidocaína

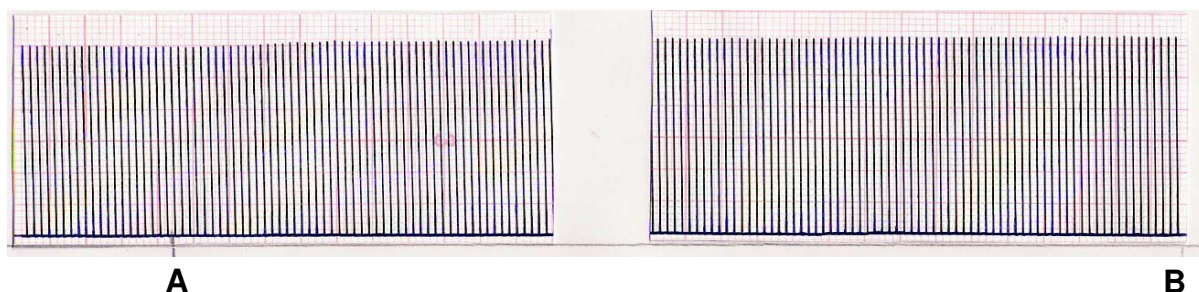


Figura 9- Efeito da bupivacaína racêmica - ($5\mu\text{g/mL}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ ms}$), em preparações nervo frênico-diafragma de rato ($n=5$). **A:** adição de bupivacaína racêmica; **B:** 60 minutos após a adição de bupivacaína racêmica

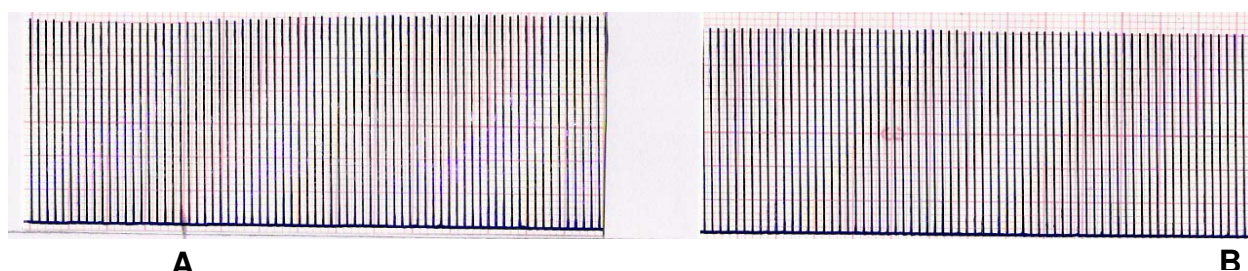


Figura 10- Efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína ($5\mu\text{g/mL}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ ms}$), em preparações nervo frênico-diafragma de rato ($n=5$). **A:** adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína; **B:** 60 minutos após a adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína

O rocurônio ($4\mu\text{g/mL}$) empregado isoladamente produziu uma redução média de $73,12 \pm 9,89\%$ na amplitude das respostas musculares à estimulação indireta (**Figura 11, Gráfico 1, Tabela 6 - Anexo**).

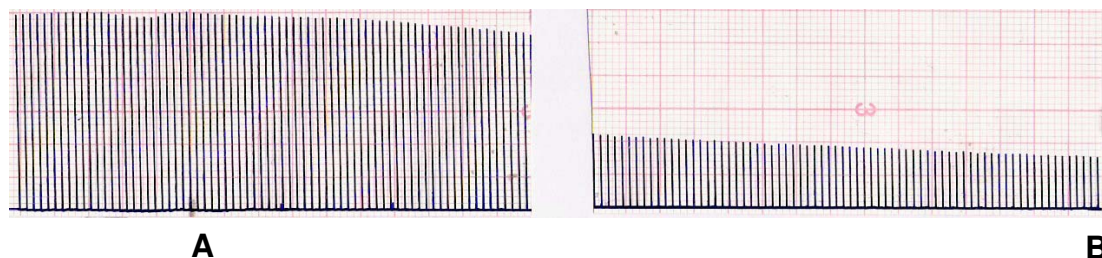


Figura 11- Efeito do rocurônio ($4\mu\text{g/mL}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ms}$), em preparações nervo frênico-diafragma de rato ($n=5$). **A:** adição de rocurônio; **B:** 60 minutos após a adição de rocurônio

4.1.2- Influência dos Anestésicos Locais (lidocaína, bupivacaína racêmica (S50-R50), mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) no bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

Em preparações expostas previamente à lidocaína ($20\mu\text{g/mL}$), o rocurônio ($4\mu\text{g/mL}$) promoveu redução de $90,10 \pm 9,15\%$ na amplitude das respostas musculares (**Figura 12, Gráfico 1 e Tabela 6 - Anexo**); nas expostas à bupivacaína racêmica ($5\mu\text{g/mL}$) e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína ($5\mu\text{g/mL}$), os bloqueios produzidos pelo rocurônio foram de 100% (**Figuras 13 e 14, Gráfico 1 e Tabelas 7 e 8 - Anexo**), respectivamente. Observou-se que nos experimentos em que se utilizou a bupivacaína nas duas formulações (R50-S50) e (R25-S75), o desaparecimento completo das respostas musculares à estimulação indireta ocorreu em aproximadamente $26,8 \pm 4,32$ minutos e $24,0 \pm 6,74$ minutos, respectivamente, após a adição do rocurônio nestas preparações (**Figuras 13 e 14**).

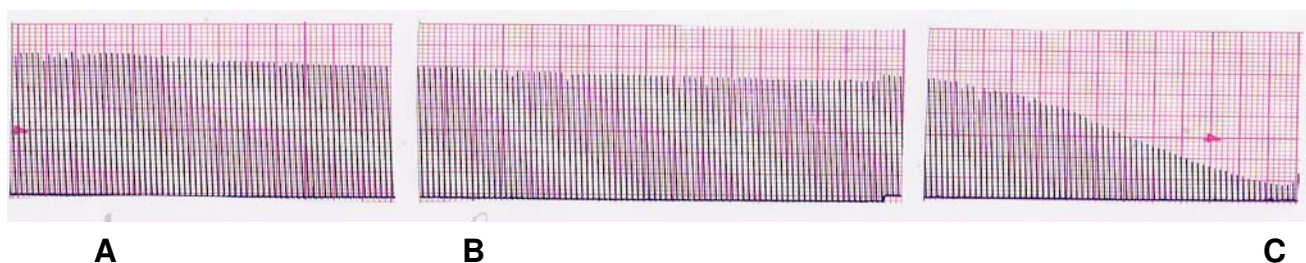


Figura 12- Efeito do rocurônio ($4\mu\text{g/mL}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ms}$), nas preparações nervo frênico-diafragma de rato ($n=5$), previamente expostas à lidocaína ($20\mu\text{g/mL}$). **A:** adição de lidocaína; **B:** adição de rocurônio, 30 minutos após a lidocaína; **C:** 60 minutos após adição de rocurônio

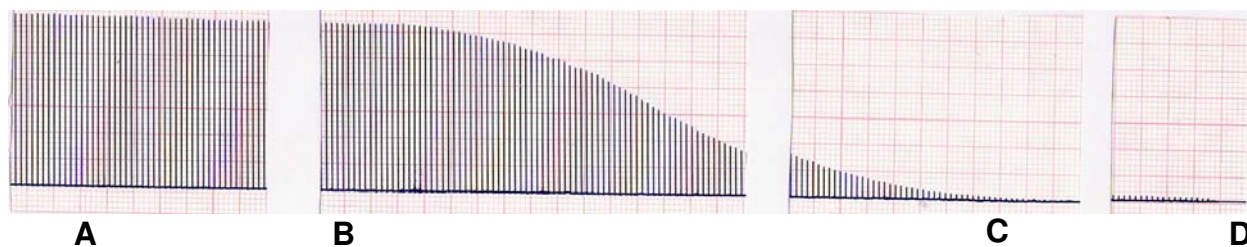


Figura 13- Efeito do rocurônio ($4\mu\text{g/mL}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ms}$), em preparações nervo frênico-diafragma de rato ($n=5$), previamente expostas à bupivacaína racêmica ($5\mu\text{g/mL}$). **A:** adição de bupivacaína racêmica; **B:** adição de rocurônio, 30 minutos após a bupivacaína racêmica; **C:** 26,8 minutos após adição de rocurônio; **D:** 60 minutos após adição de rocurônio

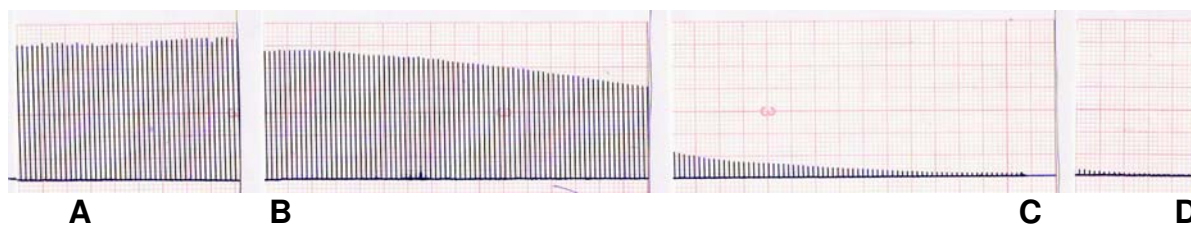


Figura 14- Efeito do rocurônio ($4\mu\text{g/mL}$) nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de $0,1\text{Hz}$ e duração de $0,2\text{ms}$), em preparações nervo frênico-diafragma de rato ($n=5$), previamente expostas à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína ($5\mu\text{g/mL}$). **A:** adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína; **B:** adição de rocurônio, 30 minutos após a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína; **C:** 24,0 minutos após adição de rocurônio; **D:** 60 minutos após adição de rocurônio

A análise estatística mostrou diferença estatisticamente significativa entre o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio empregado isoladamente e o bloqueio produzido nas preparações previamente expostas aos anestésicos locais lidocaína ($p=0,0226$), bupivacaína racêmica ($p=0,0037$) e a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína ($p=0,0037$) - (**Tabelas 6, 7, 8 - Anexos**).

A comparação entre os valores médios dos bloqueios produzidos pelo rocurônio em preparações expostas previamente à lidocaína, bupivacaína racêmica e a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína, não apresentou diferença significativa ($p= 0,1055$) (**Tabela 1**).

Tabela 1- Valores médios e desvios padrão do bloqueio (%) produzido pelo rocurônio (4 µg/mL) em preparação nervo frênico diafragma de rato, previamente exposta à lidocaína (20µg/mL), bupivacaína racêmica (5µg/mL) e a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL)

Fármacos	Bloqueio (%)	p
lidocaína	90,10 ± 9,15	0,1055
bupivacaína racêmica(S50-R50)	100 ± 0	
bupivacaína (S75-R25)	100 ± 0	

Teste de Mann-Whitney com cada grupo

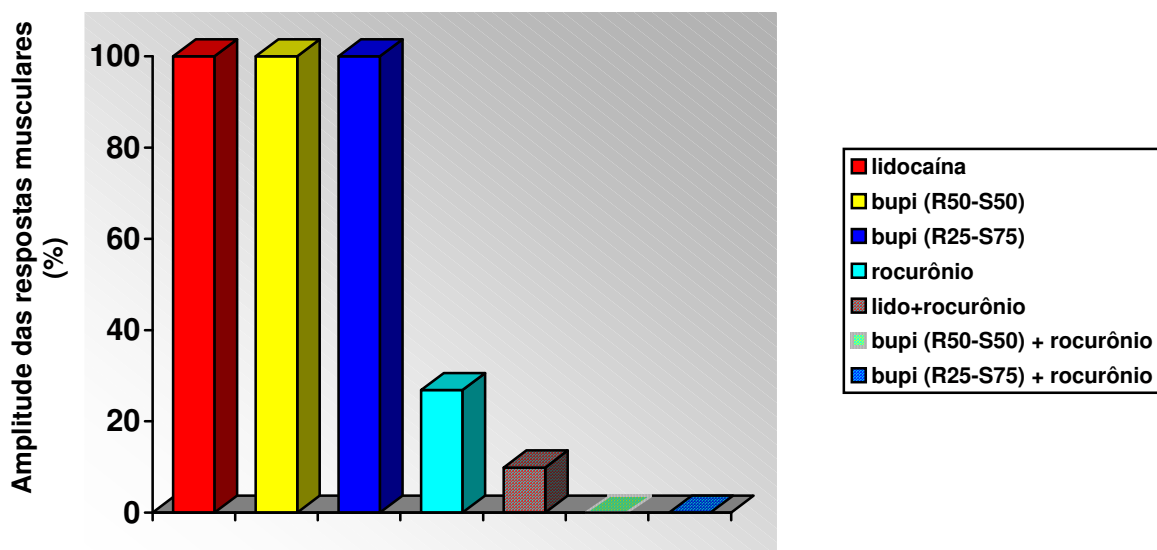


Gráfico 1- Amplitude das respostas musculares em preparações nervo frênico-diafragma de rato (n=5), expostas aos anestésicos locais e rocurônio isoladamente, e ao rocurônio em preparação previamente exposta aos anestésicos locais

4.1.3- Efeito dos Anestésicos Locais (lidocaína, bupivacaína racêmica (S50-R50), mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) na ação contraturante da acetilcolina (5 μ g/mL). Preparação *biventer cervicis* de pintainho

Na preparação *biventer cervicis* de pintainho, a lidocaína (20 μ g/mL) adicionada à preparação 30 minutos antes da acetilcolina (5 μ g/mL), promoveu diminuição de 28,77% $\pm$ 19,56 na amplitude da resposta à acetilcolina. A amplitude (%) da resposta contraturante à acetilcolina após a adição de lidocaína (71,22 $\pm$ 19,56) foi significativamente menor ($p=0,0081$) quando comparada com a resposta observada antes da adição da lidocaína (**Figura 15, Gráfico 2, Tabela 9 - Anexo**)

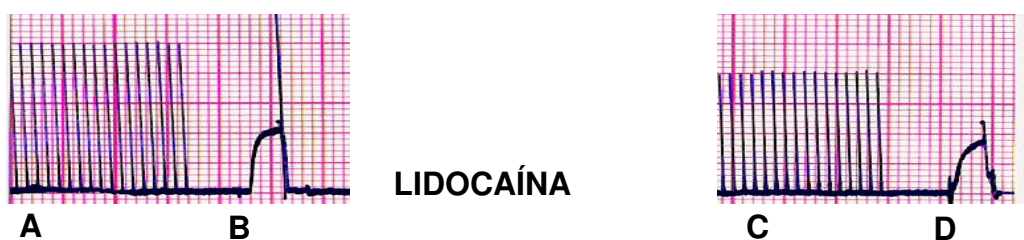


Figura 15- Registro miográfico do efeito da lidocaína (20 μ g/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5 μ g/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho (n=7), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A:** controle; **B:** adição de acetilcolina; **C:** 30 minutos após a adição de lidocaína; **D:** adição de acetilcolina

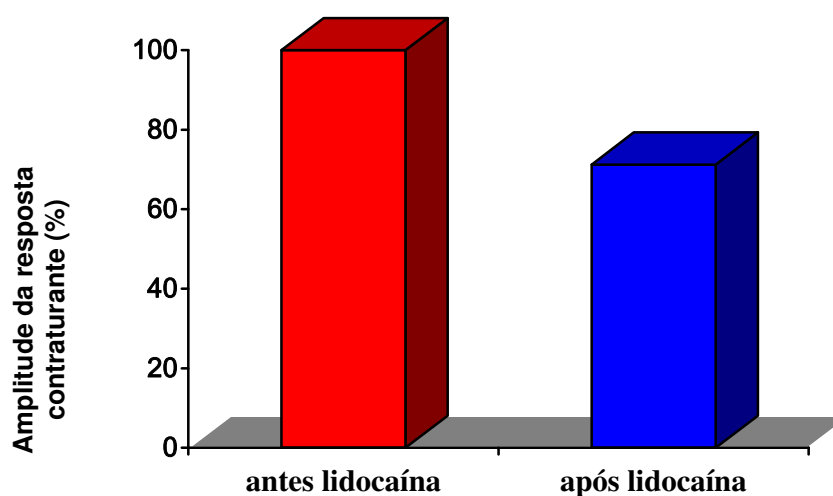


Gráfico 2- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5µg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a lidocaína (20µg/mL)

Na preparação exposta à bupivacaína racêmica (5µg/mL) houve uma diminuição de $23,70 \pm 7,12\%$ na amplitude da curva contraturante de acetilcolina. Após a adição da bupivacaína racêmica a amplitude (%) da resposta contraturante à acetilcolina ($76,31 \pm 7,12$) foi significativamente menor ($p=0,0001$) em relação à resposta controle (**Figura 16, Gráfico 3, Tabela 10 - Anexo**).



Figura 16- Registro miográfico do efeito da bupivacaína racêmica (5 µg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho (n=7), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A:** controle; **B:** adição de acetilcolina; **C:** 30 minutos após a adição de bupivacaína racêmica; **D:** adição de acetilcolina

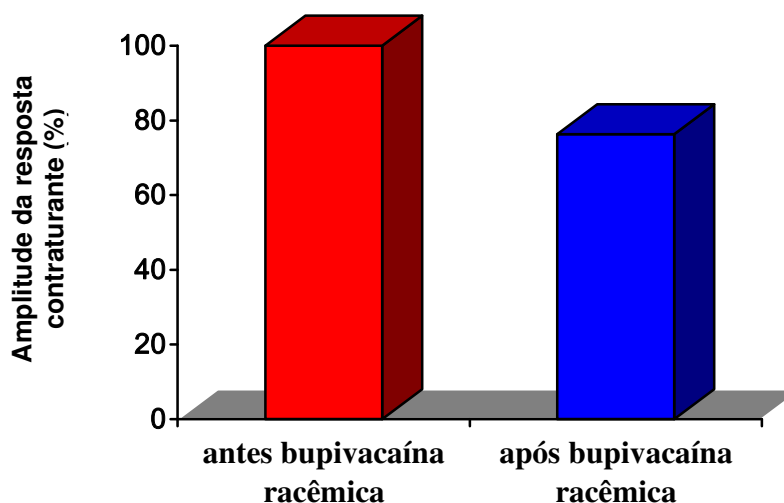


Gráfico 3- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5µg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a bupivacaína racêmica (5µg/mL)

Na preparação exposta à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL) houve uma diminuição de $33,2 \pm 11,69\%$ na amplitude da curva contraturante de acetilcolina. Após a adição da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína, a amplitude (%) da resposta contraturante à acetilcolina ($66,78 \pm 11,69$) foi significativamente menor ($p=0,0003$) em relação à resposta controle (**Figura 17, Gráfico 4, Tabela 11 - Anexo**).

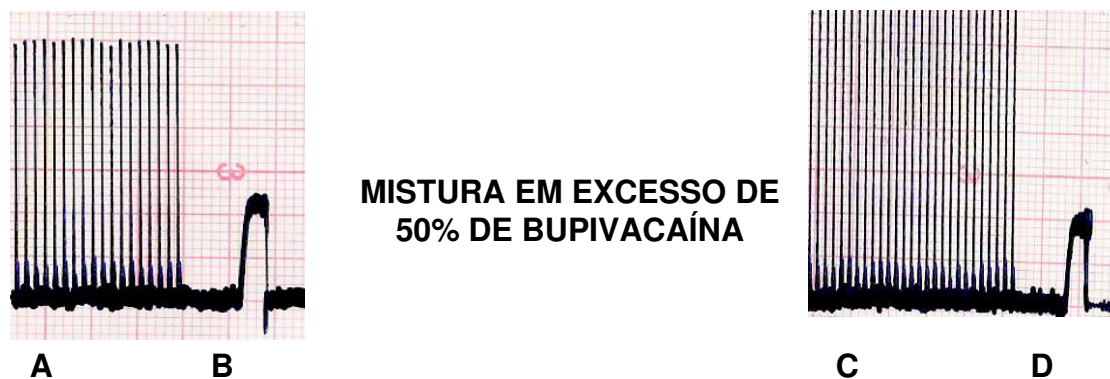


Figura 17- Registro miográfico do efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5 µg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho (n=7), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração 0,2ms). **A:** controle; **B:** adição de acetilcolina; **C:** 30 minutos após a adição da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína; **D:** adição de acetilcolina

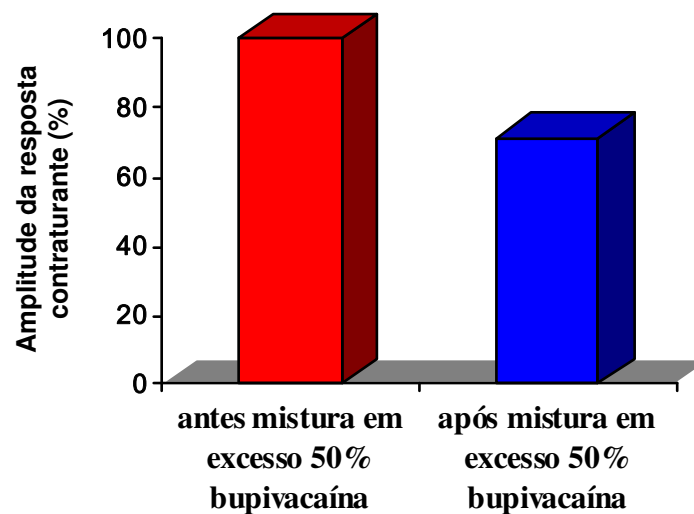


Gráfico 4- Amplitude (%) da resposta contraturante a acetilcolina (5µg/mL) em preparação *biventer-cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL)

A análise estatística mostrou que os percentuais de redução da resposta contraturante à acetilcolina foram semelhantes ($p=0,2550$) com os três anestésicos locais (**Tabela 2**).

Tabela 2- Valores médios e desvios padrão da amplitude e do percentual de redução da resposta contraturante à acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer cervicis de pintainho, após a adição de lidocaína (20µg/mL), bupivacaína racêmica (5µg/mL), e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL)

Fármacos	Amplitude da resposta		p
	contraturante a acetilcolina (%)	% de redução	
Lidocaína	71,22 ± 19,56	28,77 ± 19,56	p=0,2550
bupivacaína racêmica(S50-R50)	76,31 ± 7,12	23,70 ± 7,12	
bupivacaína (S75-R25)	66,78 ± 11,69	33,2 ± 11,69	

Teste de Kruskal-Wallis

4.2- Estudos Eletrofisiológicos

4.2.1- Efeito dos Anestésicos Locais (lidocaína, bupivacaína racêmica (S50-R50), mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) nos Potenciais de Membrana (PM)

Os anestésicos locais nas concentrações empregadas não causaram alterações significativas nas medidas do potencial de membrana, demonstrando que nestas concentrações a lidocaína, a bupivacaína racêmica, e a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína não possuem ação despolarizante sobre a fibra muscular (**Tabelas 3, 4, 5; Gráficos 5, 6, 7**).

Tabela 3- Valores médios e desvios padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de diafragma de rato expostas à lidocaína (20 μ g/mL)

Tempo (min)	Potencial medido em mV ($\bar{X} \pm DP$)	Comparação com o controle pelo teste Wilcoxon pareado
0	84,0 $\pm$ 3,00	Controle
10	87,8 $\pm$ 5,43	Não significativo
20	85,6 $\pm$ 4,61	Não significativo
30	83,4 $\pm$ 5,90	Não significativo
40	82,9 $\pm$ 3,93	Não significativo
50	86,5 $\pm$ 3,23	Não significativo
60	88,0 $\pm$ 3,46	Não significativo

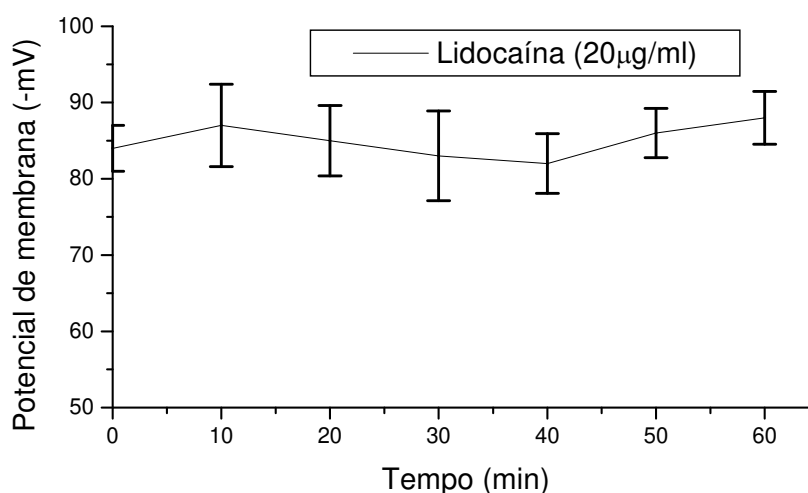


Gráfico 5- Efeito da lidocaína (20 μ g/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos

Tabela 4- Valores médios e desvios padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de diafragma de rato expostas à bupivacaína racêmica (5µg/mL)

Tempo (min)	Potencial medido em mV (x ±DP)	Comparação com o controle pelo teste Wilcoxon pareado
0	95,0 ± 2,95	Controle
10	95,4 ± 2,65	Não significativo
20	94,8 ± 1,36	Não significativo
30	93,4 ± 1,59	Não significativo
40	94,6 ± 2,19	Não significativo
50	94,9 ± 1,73	Não significativo
60	94,3 ± 0,81	Não significativo

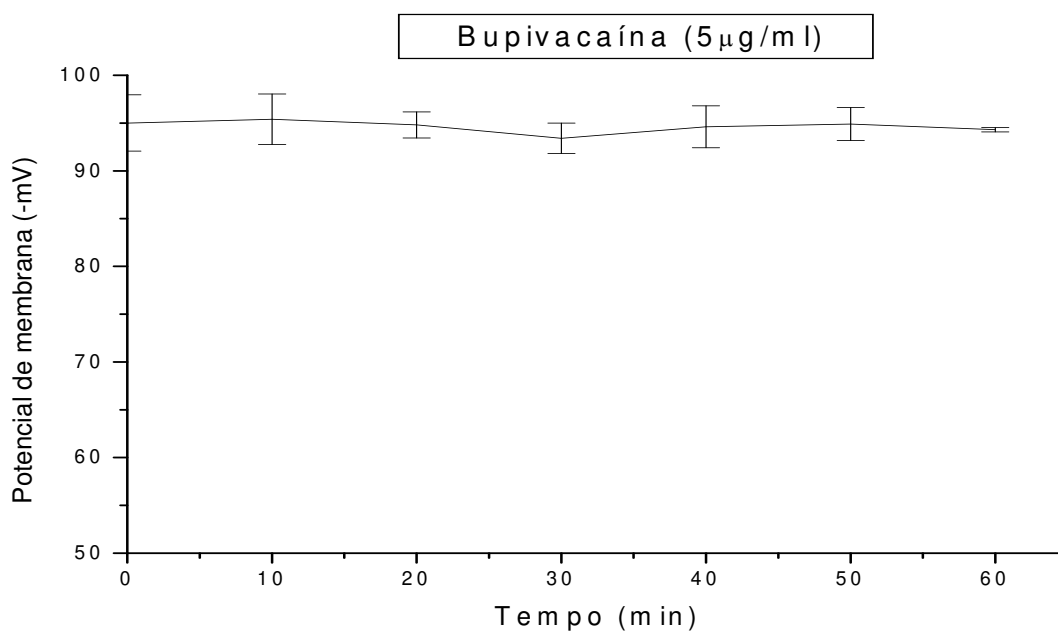


Gráfico 6- Efeito da bupivacaína racêmica (5 µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa a média ± desvio padrão de três experimentos

Tabela 5- Valores médios e desvios padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de diafragma de rato expostas à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL)

Tempo (min)	Potencial medido em mV ($\bar{x} \pm DP$)	Comparação com o controle pelo teste Wilcoxon pareado
0	96,6 $\pm$ 1,15	Controle
10	96,3 $\pm$ 0,61	Não significativo
20	96,2 $\pm$ 1,10	Não significativo
30	94,6 $\pm$ 1,64	Não significativo
40	95,3 $\pm$ 1,70	Não significativo
50	98,2 $\pm$ 0,35	Não significativo
60	97,6 $\pm$ 1,44	Não significativo

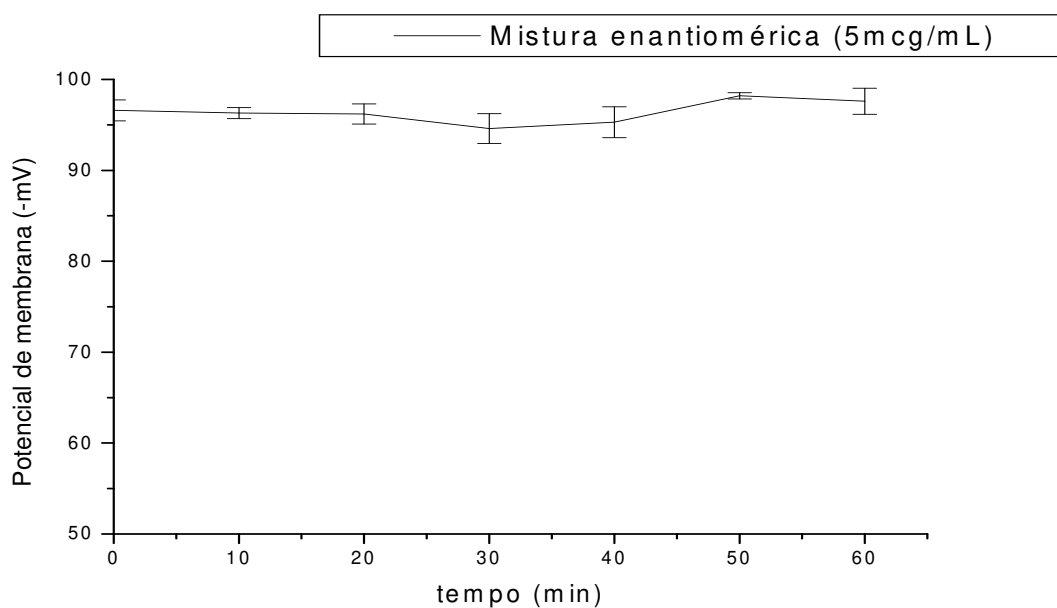


Gráfico 7- Efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5 µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa à média $\pm$ desvio padrão de três experimentos

A comparação entre os valores médios dos potenciais de membrana nas fibras musculares de diafragma de rato, observados com os anestésicos locais nos diferentes tempos estudados, mostrou diferença significativa entre a lidocaína e a bupivacaína racêmica ($p < 0,001$) e entre a lidocaína e a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa nos potenciais de membrana com a bupivacaína nas duas formulações ($p > 0,05$) (**Gráfico 8**).

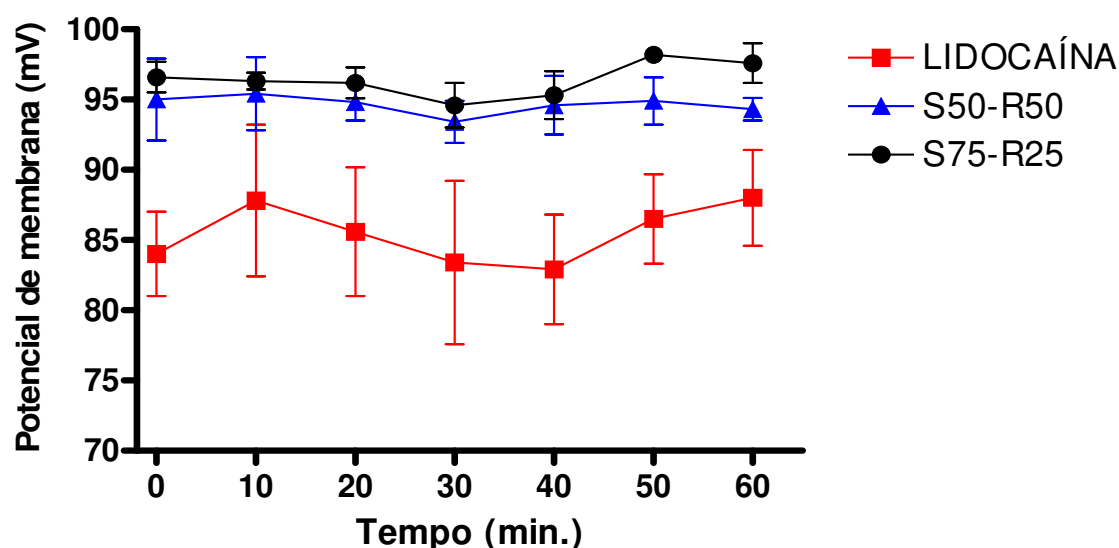


Gráfico 8- Efeito da lidocaína (20 μ g/mL), bupivacaína racêmica (S50-R50) - (5,0 μ g/mL) e bupivacaína com excesso enantiomérico de 50% (S75-R25) – (5,0 μ g/mL), no potencial de membrana nas fibras musculares de diafragma de rato. Valores médios e desvios padrão

4.2.2- Efeito dos Anestésicos Locais (lidocaína, bupivacaína racêmica (S50-R50), mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) nos Potenciais de Placa Terminal em Miniatura (PPTMs)

Na concentração estudada, a lidocaína (20 μ g/mL) inicialmente causou aumento na frequência, mas não na amplitude dos potenciais em miniatura de placa terminal, seguido de bloqueio após 60 minutos de exposição ao fármaco (**Figura 18**). A bupivacaína nas duas formulações causou diminuição na frequência e amplitude dos potenciais em miniatura de placa terminal seguida de bloqueio total aos 60 minutos (**Figuras 19 e 20**).

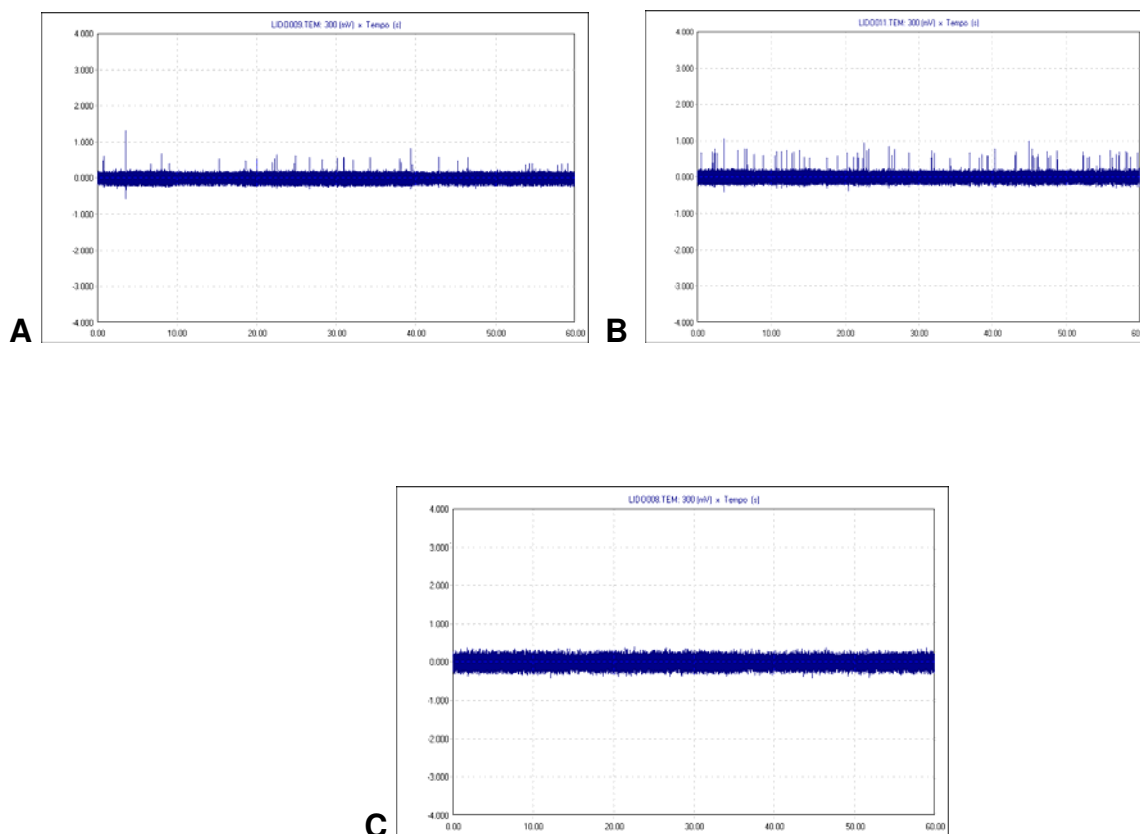


Figura 18- Efeito da lidocaína (20 μ g/mL) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação diafragma de rato. **A:** antes da adição de lidocaína (controle); **B:** 30 minutos após a adição de lidocaína; **C:** 60 minutos após a adição de lidocaína

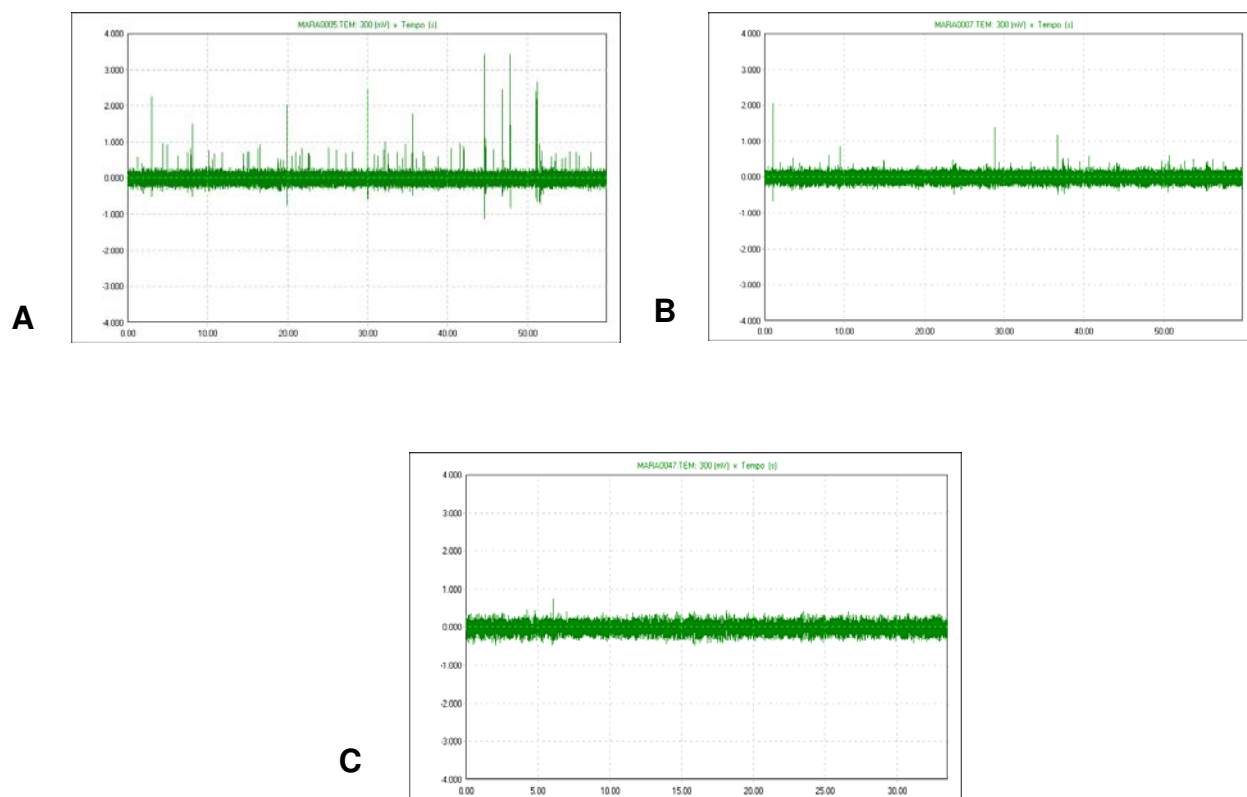


Figura 19- Efeito da bupivacaína racêmica (5 μ g/mL) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação diafragma de rato. **A:** antes da adição de bupivacaína racêmica (controle); **B:** 30 minutos após a adição de bupivacaína racêmica; **C:** 60 minutos após a adição de bupivacaína racêmica

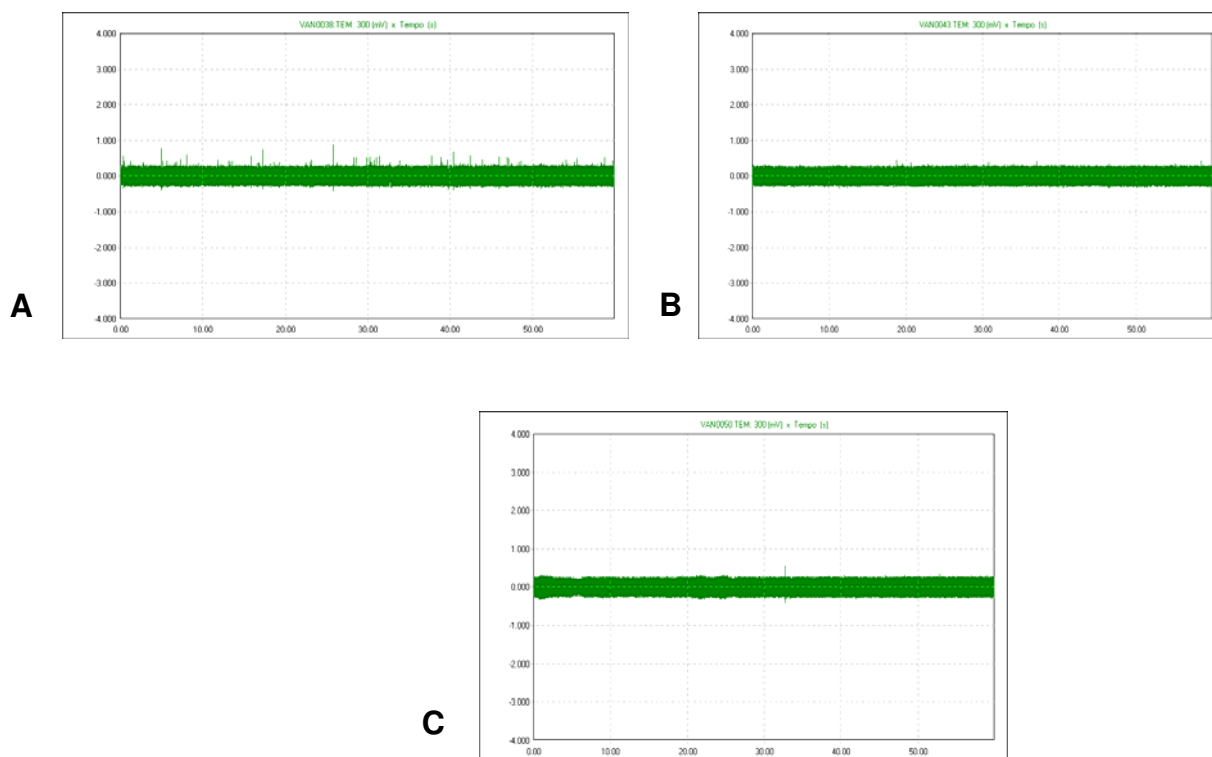


Figura 20- Efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação diafragma de rato. **A:** antes da adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (controle); **B:** 30 minutos após a adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína; **C:** 60 minutos após a adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína

5- DISCUSSÃO

Os anestésicos locais constituem um grupo de fármacos amplamente utilizados por diferentes vias de administração, tais como: tópica, infiltração subcutânea, bloqueio de nervos periféricos, anestesia neuroaxial (raquianestesia e peridural) e na prevenção e alívio da dor aguda e crônica (COVINO, 1986; YANAGIDATE e STRICHARTZ, 2006). Entre os anestésicos locais, a lidocaína, anestésico local versátil, vem sendo comumente empregada para supressão de reflexos durante as manobras de laringoscopia e intubação traqueal (DAVIDSON e GILLESPIE, 1993; YORUKOGLU et al, 2003), assim como constitui fármaco de primeira escolha no tratamento de disritmias ventriculares, com grande vantagem diante da quinidina e da procainamida, devido ao seu rápido início de ação e fácil titulação (FEREZ e MACHADO, 2007). A bupivacaína racêmica e a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína, também pertencentes à classe das amino-amidas, diferenciam-se da lidocaína por apresentarem maior potência e maior duração de ação sendo bastante utilizadas em anestesia regional (STOELTING e HILLIER, 2006).

Por constituírem moléculas anfifílicas têm grande afinidade pelas membranas celulares excitáveis inativando os canais de sódio voltagem-dependentes e impedindo assim o influxo de íons necessários à despolarização da membrana. Acredita-se que a diminuição da permeabilidade da membrana aos íons sódio ocorra por dois mecanismos: alterações gerais na fluidez da membrana com modificações conformacionais na proteína-canal de sódio voltagem-dependente e/ou pela interação específica dos anestésicos locais com os canais de sódio (RAGSDALE e AVOLI, 1998; LI et al, 1999; MIZOGAMI et al, 2002). Por outro lado, a correlação direta entre hidrofobicidade e potência anestésica indica que a partição inespecífica de grande quantidade do anestésico local na bicamada lipídica é importante para facilitar o acesso da molécula aos sítios de ligação de sódio voltagem-dependente (DE PAULA e SCHREIER, 1996; SCHREIER et al, 2000).

Há evidências de que as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos bloqueadores neuromusculares, fármacos comumente empregados em anestesia geral, podem ser modificadas por fatores como estado

ácido-básico, temperatura, monitorização, certas patologias (queimaduras, doenças do neurônio motor superior e inferior) e drogas administradas por diferentes vias (BRUCKNER et al, 1980; TOFT et al, 1990; TAIVAINEN et al, 1994; MARTINS e MARTINS, 1997; SPACEK e KRESS, 1998; HAYWOOD et al, 1999; BRAGA et al, 2001; BRAGA et al, 2002; MUNHOZ et al, 2002; NONAKA et al, 2002; MUNAKATA et al, 2004; MUNHOZ et al, 2004; CARDOSO et al, 2005; LOYOLA et al, 2006a; LOYOLA et al, 2006b; SOUSA et al, 2006; BRAGA et al, 2007; FERNANDES et al, 2007; MARTINS et al, 2007; SUZUKI et al, 2007; BARCELOS et al, 2008; BRAGA et al, 2008).

Entre os fármacos utilizados nos períodos pré ou per-operatório, alguns podem isoladamente atuar ou não na transmissão neuromuscular, assim como são capazes de potencializar ou atenuar o efeito dos bloqueadores neuromusculares. Ensaios clínicos descrevem que os anestésicos locais por via peridural, rotineiramente empregados em associação à anestesia geral, podem interagir e potencializar os efeitos dos bloqueadores neuromusculares, (TOFT et al, 1990; TAIVAINEN et al, 1994; MUNAKATA et al, 2004; SUZUKI et al, 2007).

No entanto, embora estes efeitos tenham sido demonstrados experimentalmente, em preparações isoladas e ensaios clínicos, a influência na transmissão neuromuscular e no bloqueio neuromuscular produzido por bloqueadores neuromusculares competitivos é ainda alvo de pouca investigação (ELLIS et al, 1953; MATSUO et al, 1978; BRUCKNER et al, 1980; IKEDA et al, 1984; TOFT et al, 1990; PAGALA et al, 1991; TAIVAINEN et al, 1994; NONAKA et al, 2002; MUNAKATA et al, 2004; CARDOSO et al, 2005; LOYOLA et al, 2006a; LOYOLA et al, 2006b; MARTINS et al, 2007; SUZUKI et al, 2007).

Na década de 50, ELLIS et al (1953), em experimentos realizados em gatos, observaram que a procaína embora não exerça efeito na transmissão neuromuscular intensifica o bloqueio produzido pela d-tubocurarina e succinilcolina, resultados confirmados em outros trabalhos que também relataram

ser verdadeira esta interação para outros anestésicos locais e bloqueadores neuromusculares (HARRAH et al, 1970; MATSUO et al, 1978; PAGALA et al, 1991). Estudo realizado em preparação nervo frênico – diafragma de rato, evidenciou que a cocaína pode diminuir a função muscular por reduzir a excitabilidade das membranas muscular e nervosa, sem, no entanto, afetar de maneira significativa a transmissão neuromuscular e os processos de excitação – contração (PAGALA et al, 1991).

Em nosso meio, FONTANA e VITAL BRAZIL (1973) relataram resultados semelhantes, em preparação previamente exposta à procainamida. Isoladamente, este fármaco não ocasionou alteração nas respostas musculares aos estímulos isolados, mas potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina. Estes achados foram confirmados recentemente por MARTINS et al (2007) e concluíram ser esta potencialização atribuída a um decréscimo do número de receptores pós-sinápticos disponíveis (do tipo down regulation), ocasionado pela exposição prolongada da junção neuromuscular à procainamida, e não a um efeito competitivo direto entre a procainamida e o neurotransmissor.

Estudos clínicos também demonstraram esta interação. Alguns autores observaram que a potência e a duração de ação de diferentes bloqueadores neuromusculares são aumentados pela lidocaína, bupivacaína e mepivacaína empregadas no espaço peridural, resultados clinicamente relevantes, e que enfatizam a necessidade do uso freqüente de monitorização da transmissão neuromuscular quando do emprego de anestesia geral combinada à anestesia neuroaxial (TOFT et al, 1990; TAIVAINEN et al, 1994; MUNAKATA et al, 2004; SUZUKI et al, 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que em preparação nervo frênico-diafragma de rato, a lidocaína, a bupivacaína racêmica e a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína nas concentrações empregadas, e administradas isoladamente não comprometem a transmissão neuromuscular, no entanto, o bloqueio produzido pelo rocurônio em preparações

previamente expostas aos diferentes anestésicos locais foi significativamente maior do que o observado em preparações não expostas aos anestésicos locais.

Estes resultados se assemelham ao de outras pesquisas experimentais e clínicas que também demonstraram que os anestésicos locais empregados isoladamente não comprometem a transmissão neuromuscular, mas potencializam o bloqueio neuromuscular produzido por diferentes bloqueadores neuromusculares (ELLIS et al, 1953; HARRAH et al, 1970; FONTANA e VITAL BRAZIL, 1973; MATSUO et al, 1978; TOFT et al, 1990; TAIVAINEN et al, 1994; MUNAKATA et al, 2004; CARDOSO et al, 2005; LOYOLA et al, 2006a; LOYOLA et al, 2006b; MARTINS et al, 2007; SUZUKI et al, 2007).

MATSUO et al (1978), em preparação similar à empregada neste estudo, estudaram a influência de diferentes anestésicos locais, como procaína, lidocaína e etidocaína, no bloqueio produzido pela d-tubocurarina e observaram que estes anestésicos locais, mesmo em concentrações consideradas ineficazes, aumentaram a potência da d-tubocurarina, evidenciada por diminuição significativa da ED₅₀. Também relataram que bloqueadores neuromusculares em concentrações ineficazes para causar bloqueio neuromuscular, causaram similar diminuição da ED₅₀ dos anestésicos locais. Assim, os autores concluíram que a interação bloqueadores neuromusculares - anestésicos locais pode ser devido a potencialização verdadeira causada pela ação dos dois tipos de drogas em diferentes sítios da junção neuromuscular. Pode-se, portanto inferir que os anestésicos locais diminuem a margem de segurança da junção neuromuscular facilitando a ligação dos bloqueadores neuromusculares no seu local de ação.

Mais recentemente, resultados semelhantes foram descritos por LOYOLA et al (2006a e 2006b). Estes autores estudaram em preparação nervo frênico - diafragma de rato, a ação da procaína e da lidocaína na transmissão neuromuscular e no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina e pelo rocurônio. Concluíram que os anestésicos locais isoladamente não comprometeram a transmissão neuromuscular, mas potencializaram o bloqueio produzido pelos diferentes bloqueadores neuromusculares.

Os autores também observaram o completo antagonismo com a 4-aminopiridina do bloqueio produzido pelo rocurônio nas preparações expostas à lidocaína, podendo sugerir que essa interação (lidocaína-rocurônio) tem componente predominantemente pré-sináptico, relacionado à diminuição da liberação de acetilcolina. Esta hipótese tem por suporte o antagonismo parcial pela neostigmina, uma vez que os anticolinesterásicos são eficazes apenas na reversão do bloqueio pós-sináptico (LOYOLA et al, 2006a).

Também se observou neste estudo, que nos experimentos em que se utilizou a bupivacaína nas duas formulações (R50-S50) e (R25-S75), a instalação do bloqueio neuromuscular total produzido pelo rocurônio se fez mais precocemente, em relação ao observado nas preparações expostas à lidocaína, ocorrendo em aproximadamente $26,8 \pm 4,32$ minutos e $24,0 \pm 6,74$ minutos, respectivamente.

A estrutura e as características físico-químicas destes dois anestésicos podem constituir fatores determinantes para estes achados, visto que a potência destes fármacos é maior do que a da lidocaína. Esta propriedade pode ser atribuída à maior hidrofobicidade destes dois agentes indicando uma via de acesso alternativa a sítios hidrofóbicos na proteína do canal de sódio. A solubilidade em água é uma característica essencial para o transporte da molécula do anestésico para as fibras nervosas, assim como o equilíbrio de ionização que garante a existência de formas ionizadas e não ionizadas no seu sítio de ação. Em contrapartida a solubilidade lipídica é crucial para a partição da droga no axônio, o que garante que quantidades suficientes de moléculas de anestésico local penetrem na membrana, inativando o canal de sódio. Desta forma a interpretação do mecanismo de ação deixa de ter uma abordagem restrita à importância da interação com o lipídio ou direta com a proteína canal de sódio e torna-se mais abrangente, fornecendo uma visão mais global de sua ação na membranas celulares (SCHREIER et al, 2000 ;FRACETO e DE PAULA, 2006).

Adicionalmente anestésicos locais como a ropivacaína, bupivacaína e mepivacaína, devido a sua estrutura química, apresentam a propriedade de fluidificar as membranas que em associação à hidrofobicidade parece também influenciar na sua atividade (MIZOGAMI et al, 2002). Estes autores mostraram que a fluidificação promovida pela bupivacaína e pela ropivacaína é predominantemente no núcleo da membrana, em relação à superfície, sendo mais efetiva com a bupivacaína do que com a ropivacaína. Já com a mepivacaína esta fluidificação se mostrou homogênea nas duas regiões da membrana.

A bupivacaína racêmica, a mistura enantiomérica de bupivacaína, a ropivacaína e a mepivacaína, comumente contém no seu anel piperidínico um centro quiral, fornecendo isômeros ópticos com configurações S (-) e R (+). Além da afinidade aos receptores, esta estereoisomeria também é fator que contribui para a fluidificação das membranas celulares (MIZOGAMI et al, 2002).

Neste estudo, os efeitos dos anestésicos locais também foram avaliados em outras preparações buscando-se os prováveis mecanismos dessa interação. A preparação *biventer cervicis* de pintainho possui características diferentes das preparações em mamíferos, e devido ao seu comportamento peculiar frente aos agonistas dos receptores colinérgicos nicotínicos, permitiu avaliar a afinidade da lidocaína, bupivacaína racêmica e mistura enantiomérica de bupivacaína 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).

Enquanto nos mamíferos 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.

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; BOWMAN, 1980; BOWMAN, 1994; MIRANDA et al, 2000).

Os resultados observados nesta preparação, mostram que os diferentes anestésicos locais, nas concentrações empregadas, diminuíram de maneira significativa e semelhante a resposta contraturante à acetilcolina, podendo sugerir que a interação com o rocurônio seja devido a um mecanismo competitivo entre os anestésicos locais e o neurotransmissor. Estes resultados podem ser explicados pelos achados de UETA et al (2006), que estudaram *in vitro* a atividade antagonista da bupivacaína racêmica e de seus dois enântiômeros S (-) e R (+) isoladamente, em receptores colinérgicos nicotínicos, receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), da 5-hidroxitriptamina (5-HT) e do N-metil-D-aspartato (NMDA). Os autores concluíram que a bupivacaína racêmica e seus isômeros antagonizam a atividade destes receptores de maneira similar e concentração dependentes.

No entanto, estudos realizados em junção neuromuscular de sapo e empregando métodos eletrofisiológicos e bioquímicos demonstraram que a bupivacaína não apresenta afinidade competitiva para os sítios de reconhecimento da acetilcolina no receptor nicotínico, e sim interage com sítios do canal iônico do receptor na sua conformação aberta (ARACAVA et al, 1984; IKEDA et al, 1984).

Nos experimentos com a preparação biventer cervicis de pintainho não foram observadas contraturas musculares em resposta à lidocaína, bupivacaína racêmica e mistura enantiomérica, resultados contrários aos de WALI (1984) que

relatou contratura na musculatura da ave ocasionado pela lidocaína. Esse efeito pode dever-se a um aumento na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (WALI, 1984; COLLINS, 1993). Drogas que atuam pós-sinapticamente podem bloquear a ação nos receptores e as respostas à estimulação indireta, mas não afetam a resposta à estimulação direta do músculo.

Nos estudos eletrofisiológicos, observamos que os anestésicos locais na concentração empregada não produziram alterações nas medidas do potencial de membrana das fibras musculares, mantendo-se acima de - 82 milivolts, portanto dentro dos limites de normalidade (BKAILY et al, 1998). De acordo com o descrito por BOWMAN (1980), pode-se inferir que esses fármacos não possuem ação despolarizante sobre a fibra muscular, que seu mecanismo de ação na junção neuromuscular não está relacionado à atividade estabilizadora de membrana muscular, e sim impedem a condução dos potenciais de ação propagados, sem afetar o potencial de membrana.

A ausência de alteração no potencial de membrana, também foi observado por outros autores, que estudaram os efeitos da procaína e da lidocaína em diafragma de rato (LOYOLA et al, 2006a; LOYOLA et al, 2006b).

Nos estudos eletrofisiológicos, a avaliação dos potenciais de placa terminal em miniatura, detectam pequena e contínua liberação espontânea de um quantum de acetilcolina, inefetiva para deflagrar um potencial de ação, sem a necessidade de haver um estímulo elétrico neuronal. Essa liberação é responsável por pequenos potenciais de amplitude correspondente à centésima parte do potencial de placa terminal, denominados de minipotencial de placa ou potenciais em miniatura da placa terminal, cuja função é desconhecida, mas parece estar relacionada à manutenção do trofismo muscular (FATT e KATZ, 1952).

Essa propriedade contribui para investigar a influência pré e pós-sináptica das drogas utilizadas, pela sua interferência nos processos de produção ou liberação do mediador.

Como descrito anteriormente por outros autores, a lidocaína inicialmente ocasionou aumento na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura, seguido de bloqueio (LOYOLA et al, 2006a).

Estes resultados podem sugerir que a lidocaína 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 contato prolongado com o receptor da placa terminal, possa ocasionar dessensibilização destes receptores e conseqüentemente bloqueio. Esse fenômeno de dessensibilização provocado pela interação prolongada dos receptores com a acetilcolina e análogos, tornando a placa terminal refratária à acetilcolina, pode também explicar a interação lidocaína - bloqueadores neuromusculares (THESLEFF, 1955a; THESLEFF, 1955b; VITAL BRAZIL e FONTANA, 1982; PAVANI, 1983).

Ao contrário do observado com a lidocaína, nas preparações expostas à bupivacaína nas duas formulações, houve bloqueio progressivo destes, com diminuição na frequência e na amplitude, até o seu completo desaparecimento.

Embora a lidocaína e a bupivacaína nas duas formulações empregadas isoladamente não tenham comprometido a transmissão neuromuscular, efeito evidenciado nas respostas musculares à estimulação indireta, os resultados dos estudos eletrofisiológicos mostram que estas drogas nas concentrações empregadas interferem nos potenciais em miniatura de placa terminal.

A explicação para a interação dos anestésicos locais – bloqueadores neuromusculares é multifatorial. Os anestésicos locais devido ao bloqueio da condução dentro da fibra nervosa, podem interferir com a transmissão neuromuscular, não existindo evidências de que eles inibem a síntese de acetilcolina, mas em baixas concentrações reduzem a amplitude, sem alteração na frequência do potencial de placa terminal em miniatura. Assim, a influência do anestésico local sobre esses parâmetros indica que eles diminuem a liberação da acetilcolina ou diminuem a sensibilidade da membrana pós-juncional para a

acetilcolina (STRAUGHAN, 1971; MATTHEWS e QUILLIAM, 1964; USUBIAGA e STANDAERT, 1968). O efeito pós-juncional pode ser atribuído à interferência com o receptor ocupado pelo transmissor ou com a mudança no potencial de equilíbrio do transmissor (MAENO et al, 1971; NEHER e STEINBACH, 1978; RUFF, 1982).

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

De acordo com a literatura, os resultados deste estudo mostram que, os mecanismos responsáveis pela interação entre os anestésicos locais estudados e o rocurônio são múltiplos e controversos. As alterações do potencial de placa terminal em miniatura exteriorizam uma ação pré-sináptica, modificando a liberação quantal de acetilcolina. A ausência de alterações no potencial de membrana demonstra que nesta concentração estas drogas não possuem ação despolarizante sobre a fibra muscular, e a redução na amplitude da resposta à acetilcolina reflete uma provável ação pós-sináptica, particularmente na placa motora terminal.

A associação de técnicas anestésicas que impliquem no uso simultâneo de anestésicos locais e bloqueadores neuromusculares pode ocasionar efeitos indesejáveis durante e após a realização de procedimentos cirúrgicos. Embora essa interação possa diferir entre as diferentes espécies e a extrapolação desses resultados para humanos não seja quantitativamente semelhante, as implicações clínicas dessa interação tornam imprescindível a necessidade de monitorização do bloqueio neuromuscular, meio mais adequado para se avaliar o emprego correto e seguro dos bloqueadores neuromusculares.

6- CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados neste trabalho sobre os efeitos dos anestésicos locais, lidocaína, bupivacaína racêmica e mistura enantiomérica em excesso de 50% de bupivacaína na junção neuromuscular e a sua influência no bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio, pôde-se concluir que os anestésicos locais nas concentrações estudadas:

1. não comprometeram a transmissão neuromuscular, mas potencializaram o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio;
2. não alteraram o potencial de membrana, demonstrando que o local de ação é na junção neuromuscular e não na fibra muscular;
3. apresentaram efeito pré-sináptico refletido por alterações nos potenciais de placa terminal em miniatura;
4. apresentaram efeito pós-sináptico, refletido por diminuição na resposta à acetilcolina.

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

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves TCA, Guanais O - Anestésicos locais. In: SILVA P - Farmacologia. 6^{ed}. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p.474-491.

Aberg G - Toxicological and local effects of optically active isomers of two local anaesthetic compounds. *Acta Pharmacol Toxicol*, 1972; 31: 273-286.

Andrews Ji, Kumar N, Van Den Brom RH, Olkkola KT, Roest GJ, Wright PM - A large simple randomized trial of rocuronium versus succinylcholine in rapid-sequence induction of anaesthesia along with propofol. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1999;43:4-8.

Aps C, Reynolds F - An intradermal study of the local anaesthetic and vascular effects of the isomers of bupivacaine. *Br J Clin Pharmacol*, 1978;6:63-68.

Aracava Y, Ikeda SR, Daly JW, Brookes N, Albuquerque EX - Interactions of bupivacaine with ionic channels of the nicotinic receptor. Analysis of single-channel currents. *Mol Pharmacol*, 1984;26:304-313.

Barcelos CC, Braga AFA, Braga FSS, Potério GB, Fernandes SCA, Franco YO et al. - Efeitos Neuromusculares In Vitro e In Vivo do Atracúrio e do Rocurônio em Ratos Submetidos a Tratamento de Sete Dias com Carbamazepina. *Rev Bras Anesthesiol*, 2008; 58: 137-151.

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.

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

Bkaily G, Fitts RH, Keynes RD - Contração do Músculo Esquelético. In: Guyton AC, Hall JE - Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1998, p 53-63.

Bowman WC, Rand MJ, West GB - Anestésicos locais. In: Bowman WC. Farmacologia. Barcelona:Editorial JLMS,1970.p.625-632.

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.

Braga AFA, Potério GMB, Braga FSS, Cremonesi E, Klautau A - Influência do Sevoflurano e do Isoflurano na Duração do Bloqueio Neuromuscular Produzido Pelo Rocurônio. *Rev Bras Anesthesiol*, 2001; 51: 2-9.

Braga AFA, Braga FSS, Potério GMB, Cremonesi E, Mauro G - Influência do Sevoflurano e do Isoflurano na Recuperação do Bloqueio Neuromuscular Produzido Pelo Cisatracúrio. *Rev Bras Anesthesiol*, 2002; 52: 517-524.

Braga AFA, Munhoz DC, Braga FS, Araujo DR, Potério GM, Mantovani M - Influence of stimulus frequency on blockade induced by pancuronium and rocuronium: study on rats phrenic nerve-diaphragm preparation. *Acta Cir Bras*, 2007;22:446-450

Braga AFA, Barcelos CC, Braga FS, Fernandes SC, Franco YO, Mantovani M et al. - Phenobarbital Influence on Neuromuscular Block Produced by Rocuronium in Rats. *Acta Cir Bras*, 2008;23:343-347.

Braz JRC, Vane LA, Tamburini Jr R, Vianna PTG - Influência do pH no grau de dissociação iônica dos anestésicos locais. *Rev Bras Anesthesiol*, 1983;33: 275-277.

Bruckner J, Thomas KC Jr, Bikhazi GB, Foldes FF - Neuromuscular drug interactions of clinical importance. *Anesth Analg*, 1980;59:678-682.

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

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

Catterall W, Mackie K - Local Anesthetics. In: Hardman JG et al. The pharmacological basis of therapeutics. New York: MacGraw-Hill, 9ed, 1996. p 331-347.

Clarkson CW, Hondeghem LM - Mechanism for bupivacaine depression of cardiac conduction: fast block of sodium channels during the action potential with slow recovery from block during diastole. Anesthesiology, 1985;62:396-405.

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

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

Covino BG, Vassalo HG - Aspectos Químicos dos Anestésicos Locais. In: Covino BG, Vassalo HG - Anestésicos Locais - Mecanismo de Ação e Uso Clínico. Rio de Janeiro: Colina Editora, 1985. p 16-27.

Covino BG - Pharmacology of local anaesthetic agents. Br J Anaesth, 1986; 58: 701-716.

Davidson JAH, Gillespie JA - Tracheal intubation after induction of anaesthesia with propofol, alfentanil and IV lignocaine. Br J Anaesth, 1993; 70: 163-166.

Delfino J, Vale NB, Magalhães Filho E - Ropivacaina e levobupivacaina a 0,45% associadas a opióides em anestesia peridural para cesariana: estudo comparativo. Rev Bras Anesthesiol, 1999; 49: 244-248.

De Paula E, Schreier S - Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. *Braz J Med Biol Res*, 1996;29:877-894.

Ekënstram BAF, Egner B, Pettersson G - N-alkil pyrrolidine and N-alkil piperidine carboxylic acid amides. *Acta Chem Scand*, 1957; 11: 1183-1190.

Ellis CH, Wnuck AL, De Beer EJ, Foldes FF - Modifying actions of procaine on the myoneural blocking actions of succinylcholine, decamethonium and d-tubocurarine in dogs and cats. *Am J Physiol*, 1953; 174: 277-282.

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

Fatt P, Katz B - Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol*, 1952; 117: 109.

Ferez D, Machado RC - Disritmias Cardíacas e Antidisrítmicos. In: Cangiani LM, Posso IP, Potério GMB, Nogueira CS. *Tratado de Anestesiologia – SAESP*. São Paulo: Atheneu, 2007. p 615-654.

Fernandes SCA, Braga AFA, Braga FSS, Loyola YCS, Souza SR, Barcelos CC - Influência do Lítio no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Atracúrio e pelo Cisatracúrio. Estudo em Preparações Nervo Frênico – Diafragma de Rato. *Rev Bras Anesthesiol*, 2007; 57: 289-300.

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

Fraceto LF, De Paula E - Interação de anestésicos locais com lipossomos determinada por espectroscopia de infravermelho. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*, 2006; 27:27-35.

Garcia JBS, Oliveira JR, Silva EPA, Privado MS, Yamashita AM, Issy AM - Estudo comparativo entre levobupivacaína a 0,5% e bupivacaína racêmica a 0,5% associadas ao sufentanil na anestesia peridural para cesariana. Rev Bras Anesthesiol, 2001; 51: 377-384.

Ginsborg BI, Warriner J - The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. Br J Pharmacol Chemother, 1960;15: 410-411.

Gristwood R, Bardsley H, Baker H - Reduced cardiotoxicity of levobupivacaine compared with racemic bupivacaine (Marcaine): new clinical evidence. Exp Opin Invest Drugs, 1994; 3: 1208-1212.

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

Haywood PT, Divekar N, Karalliedde LD - Concurrent medication and the neuromuscular junction. Eur J Anaesthesiol, 1999;16:77-91.

Hunter JM - The new neuromuscular blocking drugs. N Engl J Méd, 1995; 332: 1691-1699.

Ikeda SR, Aronstam RS, Daly JW, Aracava Y, Albuquerque EX - Interactions of bupivacaine with ionic channels of the nicotinic receptor. Electrophysiological and biochemical studies. Mol Pharmacol, 1984;26:293-303.

Jacob LS - Agentes Anestésicos. In: Jacob LS. NMS - National Medical Series Para Estudo Independente - Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p 90-107.

Kim JU, Lee YK, Lee YM, Yang HO, Han SM, Yang HS - The effect of phenytoin on rocuronium-induced neuromuscular block in the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation. J Neurosurg Anesthesiol, 2005;17:149-152.

Kopacz DJ, Allen HW, Thompson GE - A comparison of peridural levobupivacaine 0,75% with racemic bupivacaine for lower abdominal surgery. *Anesth Analg*, 2000; 90: 642-648.

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

Lee-Son S, Wang GK, Concus A, Crill E, Strichartz G - Stereoselective inhibition of neuronal sodium channels by local anesthetics. Evidence for two sites of action? *Anesthesiology*, 1992;77:324-335.

Li HL, Galue A, Meadows L, Ragsdale DS - A molecular basis for the different local anesthetic affinities of resting versus open and inactivated states of the sodium channel. *Mol Pharmacol*, 1999;55:134-141.

Liguori GA, Chimento GF, Borow L, Figgie M - Possible Bupivacaine Toxicity After Intraarticular Injection For Postarthroscopy Analgesia Of The Knee: Implications Of The Surgical Procedure. *Anesth Analg*, 2002; 94: 1010-1013.

Loyola YCS, Braga AFA, Potério GMB, Sousa SR, Fernandes SCA, Braga FSS - Influência da lidocaína no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Rocurônio. Estudo em Preparação Nervo Frênico – Diafragma de Rato. *Rev Bras Anestesiol*, 2006a; 56: 147-156.

Loyola YCS, Braga AFA, Potério GMB, Braga FSS, Sousa SR, Fernandes SCA et al. - Influência dos anestésicos locais no bloqueio neuromuscular produzido pela d-tubocurarina. Estudo em Preparação Nervo Frênico – Diafragma de Rato. *Medvep*, 2006b; 4: 170-180.

Maeno T, Edwards C, Hashimura S - Difference in effects and end-plate potentials between procaine and lidocaine as revealed by voltage clamp experiments. *J Neurophysiol*, 1971; 34:32-34.

Martins RS, Martins ALC - Bloqueadores neuromusculares, em: Manica J. Anestesiologia. Princípios e Técnicas. Porto Alegre, Artes Médicas, 1997; 308-331.

Martins TD, Loyola YCS, Braga AFA - Influência da procainamida sobre o bloqueio neuromuscular produzido pelo rocurônio e investigação sobre o mecanismo de ação da procainamida na junção neuromuscular. Rev Bras Anesthesiol, 2007; 57: 74-82.

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

Mather LE, Chang DH - Cardiotoxicity with modern local anaesthetics: is there a safer choice? Drugs, 2001; 61: 333-342.

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

Miranda FG, Marín JS, Aránó JÁ - 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.

Mizogami M, Tsuchiya H, Harada J - Membrane effects of ropivacaine compared with those of bupivacaine and mepivacaine. Fundam Clin Pharmacol, 2002;16: 325-330.

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

Munakata K, Suzuki T, Watanabe N, Nagai H, Kakishita M, Saeki S et al. - Influence of epidural lidocaine injection on vecuronium-induced neuromuscular blockade. Masui, 2004;53:1377-1380.

Munhoz DC, Braga AFA, Potério GMB - Influência do Propofol e do Etomidato no Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Rocurônio. Avaliação pela Aceleromiografia. Rev Bras Anesthesiol, 2002; 52:673-680.

Munhoz DC, Braga AFA, Potério GMB - Influência da Frequência de Estímulos na Instalação do Bloqueio Neuromuscular Produzido pelo Rocurônio e Pancurônio. Avaliação pelo Método Acelerográfico. Rev Bras Anesthesiol, 2004; 54: 3-12.

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

Nonaka A, Sugawara T, Suzuki S, Masamune T, Kumazawa T - Pretreatment with lidocaine accelerates onset of vecuronium-induced neuromuscular blockade. Masui, 2002;51:880-883.

Pagala MK, Venkatachari SA, Herzlich B, Ravindran K, Namba T, Grob D - Effect of cocaine on responses of mouse phrenic nerve-diaphragm preparation. Life Sci, 1991;48:795-802.

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.

Ragsdale DS, Avoli M - Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. Brain Res Rev, 1998; 26: 16-28.

Richard A, Girard F, Girard DC, Boudreault D, Chouinard P, Moumdjian R et al. - Cisatracurium-induced neuromuscular blockade is affected by chronic phenytoin or carbamazepine treatment in neurosurgical patients. Anesth Analg, 2005;100: 538-44.

Rubin AP - Anestesia e analgesia locais. In: Adams AP; Cashman JN. Anestesia, analgesia e tratamento intensivo. Rio de Janeiro:Revinter,1994.p.179-189.

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

Schreier S, Malheiros SVP, De Paula E - Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. Review. *BBA*, 2000;1508:210-234.

Simonetti MPB - Ropivacaína: Estado Atual e Perspectivas Futuras. *Rev Bras Anesthesiol*, 1995; 45:131-140.

Simonetti MPB - Contribuição da quiralidade na qualidade total na anestesia regional (Cartas ao Editor). *Rev Bras Anesthesiol*, 1997a; 47: 86-88.

Simonetti MPB - S (-) bupivacaine and RS (+) bupivacaine: a comparison of effects on the right and left atria of the rat. *Reg Anesth*, 1997b; 22 (Supp 2S):58.

Simonetti MPB, Batista RA, Ferreira MCF - Estereoisomeria: A interface da tecnologia industrial de medicamentos e da racionalização terapêutica. *Rev Bras Anesthesiol*, 1998; 48: 390-399.

Simonetti MPB, Ferreira FMC - Does the D-isomer of bupivacaine contribute to the improvement of efficacy in neural block? *Reg Anaesth and Pain Med*, 1999; 24: (Supp) 43.

Simonetti MPB, Ferreira Jr R, Bird RA - Optimization of the therapeutic index of bupivacaine through the manipulation of the enantiomeric ratio. 12th WCA, 2000; Abstrat, P6.4.05.pg247.

Simonetti MPB - Comparação entre os efeitos hemodinâmicos da intoxicação aguda com Bupivacaína racêmica e a mistura com excesso enantiomérico de 50% (S75:R25). Estudo Experimental em Cães (Cartas ao Editor). *Rev Bras Anesthesiol*, 2006; 56: 679-682.

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

Sousa SRS, Braga AFA, Potério 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. Rev Bras Anesthesiol, 2006; 56: 157-67.

Spacek A, Kress HG - Drug interactions with muscle relaxants. Acta Anaesthesiol Scand, 1998; 42 (Suppl 112): 236-238.

Spacek A, Nickl S, Neiger FX, Nigrovic V, Ullrich OW, Weindmayr-Goettel M et al - Augmentation of the rocuronium-induced neuromuscular block by the acutely administered phenytoin. Anesthesiology, 1999;90:1551-1555.

Sparr HJ, Beaufort TM, Fuchs-Buder T - Newer neuromuscular blocking agents: how do they compare with established agents? Drugs, 2001; 61: 919.

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

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.

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

Strichartz GR, Covino BG - Anestésicos Locais. In: Miller RD. Anestesia. 3ed. vol.1. São Paulo:Artes Médicas,1993. p.424-434.

Suzuki T, Mizutani H, Ishikawa K, Miyake E, Saeki S, Ogawa S - Epidurally administered mepivacaine delays recovery of train-of-four ratio from vecuronium-induced neuromuscular block. Br J Anaesth, 2007;99:721-725.

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

Tempelhoff R, Modica PA, Jellish WS, Spitznagel EI - Resistance to atracurium-induced neuromuscular blockade in patients with intractable seizure disorders treated with anticonvulsants. *Anesth Analg*, 1990;71:665-669.

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

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

Toft P, Kirkegaard Nielsen H, Severinsen I, Helbo-Hansen HS - Effect of epidurally administered bupivacaine on atracurium-induced neuromuscular blockade. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1990; 34: 649-652.

Trachez MM, Zapata-Sudo G, Moreira OR, Chedid NG, Russo VF, Russo EM et al. - Motor nerve blockade potency and toxicity of non-racemic bupivacaine in rats. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2005;49:66-71.

Ueta K, Sugimoto M, Suzuki T, Uchida I, Mashimo T - In vitro antagonism of recombinant ligand-gated ion-channel receptors by stereospecific enantiomers of bupivacaine. *Reg Anesth Pain Med*, 2006;31:19-25.

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

Vanhoutte F, Vereecke J, Verbeke N, Carmeliet E - Stereoselective effects of the enantiomers of bupivacaine on the electrophysiological properties of the guinea-pig papillary muscle. *Br J Pharmacol*, 1991;103:1275-1281.

Vital Brazil O, Fontana MD - Effect of 4- Aminopyridine on the desensitization of the rat diaphragm caused by carbachol. In: Lechat P et al.- Aminopyridines and similarly acting drugs; effects on nerves muscles and synapses. Oxford, Pergamon. 1982, p.240.

Yanagidate F, Strichartz GR - Local Anesthetics. *Hep*, 2006; 177:91-123.

Yano T, Ibusuki S, Takasaki M - A comparison of intracellular lidocaine and bupivacaine concentrations producing nerve conduction block in the giant axon of crayfish in vitro. *Anesth Analg*, 2006;102:1734-1738.

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

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

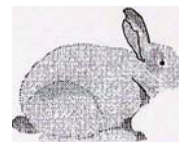
Waud BE - Neuromuscular blocking agents. In: Waud BE - *Advances in Anesthesia*. Chicago, Gallagher, Year Book Medical Publishers. 1984, p. 337-382.

Wulf H - Do "lefthanders" make better local anesthetics? The relevance of stereoisomerism in clinical practice as shown by new local anesthetics. *Anaesthesist*, 1997; 46: 622-626.

Adotada Normalização Vancouver - International Committee of Medical Journal Editors, 1997)

8- ANEXOS

**ANEXO 1- Comissão de Ética na Experimentação
Animal – CEEA - IB-UNICAMP**



**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia**

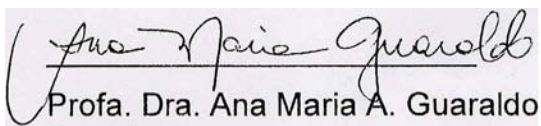
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1204-1, sobre **"Efeitos de anestésicos locais na transmissão neuromuscular e sua influência no bloqueio neuromuscular produzido por diferentes bloqueadores neuromusculares. Estudo experimental"**, sob a responsabilidade de **Dra. Angélica de Fátima Assunção Braga**, 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)-IBUNICAMP em 27 de fevereiro de 2007.

CERTIFICATE

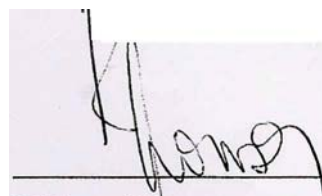
We certify that the protocol nO 1204-1, entitled **"Effects of local anaesthetics in neuromuscular transmission and the influence in neuromuscular blockade produced by different neuromuscular blockers. Experimental Study"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 27.2007.

campinas, 27 de fevereiro de 2007.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

CEENIB - Unicamp
Caixa Postal 6109



Fátima Alonso
Secretária Executiva

13083-970 Campinas, SP – Brasil
Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/cealindex.htm>

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

ANEXO 3 - Processo Editorial

Prezada Profa. Angélica de Assunção Braga,

A Revista Acta Cirúrgica Brasileira está indexada em todas as agências, nacionais e internacionais, que avaliam os artigos publicados.

Além da forma e do conteúdo do trabalho leva-se em conta o esmero do idioma, que tem merecido nossa atenção.

O nosso interesse é mútuo para que a publicação seja bem recebida pelos leitores e pelos avaliadores, que estão cada vez mais exigentes.

Encaminho, em anexo, o artigo para as devidas correções e atendimento às solicitações do nosso revisor.

Aguardarei sua manifestação a respeito.

Atenciosamente,

Prof. Saul Goldenberg

Editor Responsável - Acta Cir Brás

Prezada Profa. Angélica de Assunção Braga

Encaminho o artigo para a revisão final. Solicito enviar o artigo, corrigido, pronto para a publicação. Favor incluir as figuras no texto nos locais indicados.

Aguardarei retorno.

Atenciosamente,

Prof. Saul Goldenberg

ANEXO 4- TABELAS

Tabela 6- Valores individuais, médias e desvios padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico diafragma de rato, causada pelo rocurônio isoladamente (4 µg/mL) e pelo rocurônio (4 µg/mL) em preparação previamente exposta a lidocaína (20 µg/mL)

Experimentos (n=5)	rocurônio	rocurônio e lidocaína	p
1	80,0	100	
2	70,0	83,33	
3	66,0	81,48	
4	63,0	85,71	
5	86,6	100	
X ± DP	73,12 ± 9,89	90,10 ± 9,15	0,0226
Teste t de Student			

Tabela 7- Valores individuais, médias e desvios padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico diafragma de rato, causada pelo rocurônio isoladamente (4 µg/mL) e pelo rocurônio (4 µg/mL) em preparação previamente exposta a bupivacaína racêmica (S50-R50) - (5µg/mL)

Experimentos (n=5)	rocurônio	rocurônio e bupivacaína racêmica	p
1	80,0	100	
2	70,0	100	
3	66,0	100	
4	63,0	100	
5	86,6	100	
X ± DP	73,12 ± 9,89	100 ± 0	0,0037

Teste t de Student

Tabela 8- Valores individuais, médias e desvios padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico diafragma de rato, causada pelo rocurônio isoladamente (4 µg/mL) e pelo rocurônio (4 µg/mL) em preparação previamente exposta a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5,0µg/mL)

Experimentos (n=5)	rocurônio	rocurônio e bupivacaína (S75-R25)	p
1	80,0	100	
2	70,0	100	
3	66,0	100	
4	63,0	100	
5	86,6	100	
X ± DP	73,12 ± 9,89	100 ± 0	0,0037
Teste t de Student			

Tabela 9- Valores individuais, médias, desvios padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta causada pela Acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer cervicis de pintainho, antes e após a adição de lidocaína (20µg/mL)

Experimentos (n=7)	antes da lidocaína	após a lidocaína	% de redução	p
1	100	90,0	10,0	
2	100	71,4	28,6	
3	100	90,0	10,0	
4	100	71,4	28,6	
5	100	62,5	37,5	
6	100	33,3	66,7	
7	100	80,0	20,0	
X ± DP	100	71,22 ± 19,56	28,77 ± 19,56	0,0081

Teste t de Student para amostras pareadas

Tabela 10- Valores individuais, médias, desvios padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta causada pela Acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer cervicis de pintainho, antes e após a adição de bupivacaína racêmica (S50-R50) - (5,0µg/mL)

Experimentos (n=7)	antes da bupivacaína racêmica	após a bupivacaína racêmica	% de redução	p
1	100	80,0	20,0	
2	100	62,5	37,5	
3	100	71,4	28,6	
4	100	83,3	16,7	
5	100	77,0	23,1	
6	100	80,0	20,0	
7	100	80,0	20,0	
X ± DP	100	76,31 ± 7,12	23,70 ± 7,12	0,0001

Teste t de Student para amostras pareadas

Tabela 11- Valores individuais, médias, desvios padrão e percentual de redução da amplitude (%) da resposta causada pela Acetilcolina (5µg/mL) em preparação biventer cervicis de pintainho, antes e após a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5,0µg/mL)

Experimentos (n=7)	antes da bupivacaína (S75-R25)	após a bupivacaína (S75-R25)	% de redução	p
1	100	75,0	25,0	
2	100	69,2	30,8	
3	100	73,3	26,7	
4	100	50,0	50,0	
5	100	50,0	50,0	
6	100	73,3	26,7	
7	100	76,7	23,3	
X ± DP	100	66,78 ± 11,69	33,2 ± 11,69	0,0003

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas

