

VANESSA HENRIQUES CARVALHO

**Ação dos Anestésicos Locais na
Transmissão Neuromuscular e Influência
no Bloqueio Produzido pelo Pancurônio.
Eficácia da Neostigmina e da 4-
Aminopiridina na Reversão do Bloqueio
Neuromuscular.
Estudo Experimental**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

VANESSA HENRIQUES CARVALHO

**Ação dos Anestésicos Locais na
Transmissão Neuromuscular e Influência
no Bloqueio Produzido pelo Pancurônio.
Eficácia da Neostigmina e da 4-
Aminopiridina na Reversão do Bloqueio
Neuromuscular.
Estudo Experimental**

ORIENTADORA: *Profa. Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga*

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VANESSA
HENRIQUES CARVALHO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ANGÉLICA DE FÁTIMA DE ASSUNÇÃO BRAGA.

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica Universidade Estadual
de Campinas Biblioteca da Faculdade de
Ciências Médicas Maristella Soares dos
Santos - CRB 8/8402

C253a Carvalho, Vanessa Henriques, 1974-
Ação dos anestésicos locais na transmissão neuromuscular e influência no bloqueio produzido pelo pancurônio : eficácia da neostigmina e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular : estudo experimental / Vanessa Henriques Carvalho. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Anestésicos locais. 2. Bloqueadores neuromusculares. 3. Transmissão neuromuscular. I. Braga, Angélica de Fátima de Assunção, 1952-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Action of local anaesthetics in neuromuscular transmission and influence in the block produced by pancuronium : efficacy of neostigmine and 4-aminopyridine in the reversal of neuromuscular blockade : experimental study

Palavras-chave em

inglês: Local anaesthetics
Neuromuscular blocking
drugs Neuromuscular
transmission

Área de concentração:

Farmacologia **Titulação:** Doutora
em Farmacologia **Banca**

examinadora:

Angélica de Fátima de Assunção Braga [Orientador]
Derli Conceição Munhoz Servian
Eunice Sizue Hirata
Norma Sueli Pinheiro Módolo
Luiz Vicente Garcia

Data de defesa: 17-12-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

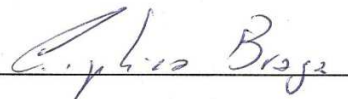
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

VANESSA HENRIQUES CARVALHO

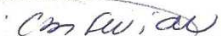
Orientador (a) PROF(A). DR(A). ANGÉLICA DE FÁTIMA ASSUNÇÃO BRAGA

MEMBROS:

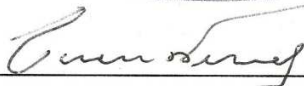
1. PROF(A). DR(A). ANGÉLICA DE FÁTIMA ASSUNÇÃO BRAGA



2. PROF(A). DR(A). DERLI CONCEIÇÃO MUNHOZ SERVIAN



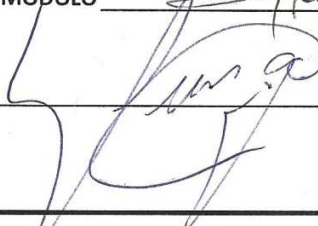
3. PROF(A). DR(A). EUNICE SIZUE HIRATA



4. PROF(A).DR(A). NORMA SUELI PINHEIRO MÓDOLO



5. PROF(A).DR(A). LUIZ VICENTE GARCIA



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

Data: 17 de dezembro de 2013

DEDICATÓRIA

Acima de tudo e todos : **Deus.**

Muito obrigada por me dar força e saúde para concluir mais uma jornada.

Minha querida família.

Eu não seria nada sem vocês.

Paulo, Rafael e Leonardo.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Profa Dra Angélica de Fátima de Assunção Braga.

Não há palavras para expressar a minha eterna gratidão.

Obrigada por me aceitar e me ensinar como me tornar uma professora doutora. Sua orientação foi fundamental.

Meu sincero carinho e admiração.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Henrique e Eliete pela ajuda na revisão da língua portuguesa e pelo eterno incentivo, apoio e dedicação.

Ao meu irmão Luciano pelo apoio. Ao meu sogro Sr Peter pela ajuda ao salvar meus arquivos.

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

Aos professores: Dr. Edson Antunes, Dra. Derli Munhoz Servian e Dra. Rosa Inês Costa Pereira, pelas sugestões importantes no meu exame de qualificação.

Ao professor doutor Gabriel Forato Anê coordenador da pós-graduação em farmacologia, pelo apoio e incentivo.

À Sirlei Sian Moraes pela orientação na análise estatística e à Dra Arneth Rodrigues Ribeiro pela colaboração com a língua inglesa.

À Professora Dra. Lea Rodrigues Simioni pela importante ajuda na pesquisa.

Ao técnico e amigo Gildo pela grande colaboração na parte experimental, ajuda e paciência. Sou eternamente grata.

Aos funcionários do departamento de anestesiologia pela ajuda e ao senhor Lúcio Gurgel pela ajuda na informática.

Aos colegas anestesiológicos, cirurgiões, funcionários e pacientes de todos os Hospitais que eu trabalhei e trabalho por alegrarem meus dias.

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

À amiga Cristina de Sá Resende, grande Anestesiologista que se foi em 2010.

Ao meu grande R2 Humberto Lúcio Sobrinho que se foi este ano.

Ao meu querido Ballet por ter me ensinado a ter disciplina e força. ***“Não danço para esquecer a vida e sim, para lembrar que ela existe”.***

SUMÁRIO

RESUMO.....	xxix
ABSTRACT.....	xxxi
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	33
2 OBJETIVOS.....	49
2.1 Geral.....	51
2.2 Específicos.....	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1 Animais utilizados.....	55
3.2 Fármacos e concentrações utilizadas.....	55
3.3 Estudos Biológicos.....	56
3.3.1 Preparação nervo frênico – hemidiafragma de rato.....	56
3.3.2 Influência dos anestésicos locais: ropivacaína, levobupivacaína, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) na transmissão neuromuscular e no bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio.....	58
3.3.3 Influência dos anestésicos locais: ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) sobre a ação contraturante da acetilcolina - Preparação músculo biventer cervicis de pintainho.....	59
3.4 Estudos Eletrofisiológicos.....	61
3.4.1 Montagem da Preparação e Confecção dos Microeletrodos (Me).....	61
3.4.2 Descrição do circuito.....	62
3.4.3 Influência dos anestésicos locais: ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) nos Potenciais de Membrana (PM).....	64
3.4.4 Influência dos anestésicos locais: ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) nos Potenciais de placa terminal em miniatura (PPTMs).....	65
3.5 Análise Estatística.....	65
4 RESULTADOS.....	67
4.1 Estudos Biológicos.....	69
4.1.1 Influência dos Anestésicos Locais (ropivacaína, levobupivacaína, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) e do pancurônio nas respostas musculares em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato.....	69
4.1.2 Influência dos Anestésicos Locais (ropivacaína, levobupivacaína, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) no bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato	71
4.1.3 Eficácia da neostigmina (2µg/mL) e da 4-aminopiridina(20µg/mL) na reversão do bloqueio produzido pelo pancurônio isoladamente e pela associação pancurônio- anestésicos locais (ropivacaína, levobupivacaína, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25)), em preparação nervo frênico hemidiafragma de rato.....	73
4.1.4 <i>Influência dos Anestésicos Locais (ropivacaína, levobupivacaína, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) na ação contraturante da acetilcolina (5µg/mL).Preparação biventer cervicis de pintainho.....</i>	75

4.2 Estudos Eletrofisiológicos.....	80
4.2.1 Influência dos Anestésicos Locais (ropivacaína, levobupivacaína, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) nos Potenciais de Membrana (PM)	80
4.2.2 Influência dos Anestésicos Locais (ropivacaína, levobupivacaína, mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) nos Potenciais de Placa Terminal em Miniatura (PPTM)	84
5 DISCUSSÃO.....	85
6 CONCLUSÕES.....	99
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
8 ANEXOS.....	117
8.1 Anexo 1 Comissão de Ética na Experimentação Animal- CEEA-IB-UNICAMP-Protocolo nº 2346-1...	119
8.2 Anexo 2 COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.....	120
8.3 Anexo 3 – Artigo publicado na ACTA CIRURGICA BRASILEIRA-vol.28 (11) 2013.....	123
8.4 Anexo 4 – Artigo aceito para publicação-Revista Brasileira de Anestesiologia.....	127
8.5. Anexo 5 – Tabelas.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS

AL – Anestésico local

Ach - Acetilcolina

BNM – Bloqueador neuromuscular

°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-hemidiafragma

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão do bloqueio (%) produzido pelo pancurônio (2,0 µg/mL) em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato, previamente exposta à ropivacaína, levobupivacaína e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25, na concentração de 5,0 µg/mL	72
Tabela 2. Valores médios e desvios-padrão do percentual de redução (%) da resposta contraturante à acetilcolina (5 µg/mL), produzido pelos anestésicos locais (ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína – (S75-R25), em preparação biventer cervicis de pintainho	80
Tabela 3. Valores médios e desvios-padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de diafragma de rato expostas à ropivacaína (5 µg/mL)	81
Tabela 4. Valores médios e desvios-padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de diafragma de rato expostas à levobupivacaína (5 µg/mL)	82
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 (5 µg/mL)	83
Tabela 6. Valores individuais, médias e desvios-padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares à estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato, causada pelo pancurônio isoladamente (2 µg/mL) e pelo pancurônio (2 µg/mL) em preparação previamente exposta à ropivacaína (5 µg/mL)	140
Tabela 7. Valores individuais, médias e desvios-padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares à estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato, causada pelo pancurônio isoladamente (2 µg/mL) e pelo pancurônio (2 µg/mL) em preparação previamente exposta à levobupivacaína (5µg/mL)	140
Tabela 8. Valores individuais, médias e desvios-padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares à estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato, causada pelo pancurônio isoladamente (2 µg/mL) e pelo pancurônio (2 µg/mL) em preparação previamente exposta à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5 µg/mL)	141
Tabela 9. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio isoladamente (2 µg/mL) e após reversão do bloqueio com neostigmina (2 µg/mL)	141
Tabela 10. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio isoladamente (2 µg/mL) e após reversão do bloqueio com 4- aminopiridina (20 µg/mL)	142
Tabela 11. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e ropivacaína (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com neostigmina (2 µg/mL)	142

Tabela 12. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e levobupivacaína (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com neostigmina (2 µg/mL)	143
Tabela 13. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com neostigmina (2 µg/mL)	143
Tabela 14. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e ropivacaína (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com 4- aminopiridina (20 µg/mL)	144
Tabela 15. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e levobupivacaína (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com 4- aminopiridina (20 µg/mL)	144
Tabela 16. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com 4- aminopiridina (20 µg/mL)	145
Tabela 17. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude da resposta (%) causada pela Acetilcolina (5 µg/mL), antes e após a adição de ropivacaína (5 µg/mL), e percentual de redução, em preparação biventer cervicis de pintainho	145
Tabela 18. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude da resposta (%) causada pela Acetilcolina (5 µg/mL), antes e após a adição de levobupivacaína (5 µg/mL) e percentual de redução, em preparação biventer cervicis de pintainho	146
Tabela 19. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude da resposta (%) causada pela Acetilcolina (5 µg/mL), antes e após a adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) - (5 µg/mL) e percentual de redução, em preparação biventer cervicis de pintainho	146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular dos Anestésicos Locais	37
Figura 2. Estrutura molecular da ropivacaína	40
Figura 3. Estrutura molecular da levobupivacaína	41
Figura 4. Estrutura molecular da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25)	42
Figura 5. Estrutura molecular do pancurônio	44
Figura 6. Esquema da preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato	58
Figura 7. Microeletrodo e montagem de aparelhagem para os experimentos eletrofisiológicos	63
Figura 8. Efeito da ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). A: adição do anestésico local (5,0 µg/mL); B: 60 minutos após a adição do anestésico local. Traçado superior (ropivacaína); traçado médio (levobupivacaína); traçado inferior (S75-R25)	70
Figura 9. Efeito do pancurônio nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). A: adição de pancurônio (2,0 µg/mL); B: 60 minutos após a adição de pancurônio	70
Figura 10. Efeito do pancurônio nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1Hz e duração de 0,2 ms), em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente exposta à ropivacaína, levobupivacaína e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25. A: adição do anestésico local (5,0 µg/mL); B: adição do pancurônio (2,0 µg/mL) 30 minutos após exposição ao anestésico local; C: 60 minutos após a adição do pancurônio. Traçado superior (pancurônio + ropivacaína); traçado médio (pancurônio + levobupivacaína); traçado inferior (pancurônio + S75-R25)	71
Figura 11. Efeito da neostigmina (2,0 µg/mL) e da 4-aminopiridina (20 µg/mL), na reversão do bloqueio produzido pelo pancurônio isoladamente, em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). A: adição do pancurônio (2,0µg/mL); B: 60 minutos após adição do pancurônio; C: adição da neostigmina (traçado superior) e da 4-aminopiridina (traçado inferior)	73
Figura 12. Efeito da neostigmina na reversão do bloqueio produzido pelo pancurônio em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5) previamente exposta a ropivacaína (traçado superior), levobupivacaína (traçado médio) e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 (traçado inferior). A: adição do anestésico local (5,0 µg/mL); B: 30 minutos após adição do anestésico local e adição do pancurônio (2,0 µg/mL); C: 60 minutos após adição do pancurônio e reversão com neostigmina (2,0 µg/mL)	74

- Figura 13.** Efeito da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio produzido pelo pancurônio em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5) previamente exposta à ropivacaína (traçado superior), levobupivacaína (traçado médio) e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 (traçado inferior). **A:** adição do anestésico local (5,0 µg/mL); **B:** 30 minutos após adição do anestésico local e adição do pancurônio (2,0 µg/mL); **C:** 60 minutos após adição do pancurônio e reversão com 4-aminopiridina (20 µg/mL) 74
- Figura 14.** Registro miográfico do efeito da ropivacaína (5,0 µg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5 µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho (n=4), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração 0,2 ms). **A:** controle; **B:** adição de acetilcolina; **C:** 30 minutos após a adição de ropivacaína **D:** adição de acetilcolina 76
- Figura 15.** Registro miográfico do efeito da levobupivacaína (5,0 µg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5 µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho (n=4), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração 0,2 ms). **A:** controle; **B:** adição de acetilcolina; **C:** 30 minutos após a adição de levobupivacaína, **D:** adição de acetilcolina 77
- Figura 16.** Registro miográfico do efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 (5,0 µg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5,0 µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho (n=5), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração 0,2 ms). **A:** controle; **B:** adição de acetilcolina; **C:** 30 minutos após a adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25; **D:** adição de acetilcolina 78
- Figura 17.** Efeitos da ropivacaína (traçado superior), levobupivacaína (traçado médio) e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (traçado inferior) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação diafragma de rato. **A:** antes da adição do anestésico local (controle); **B:** 30 minutos após a adição do anestésico local; **C:** 60 minutos após a adição do anestésico local 84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Amplitude (%) da resposta contraturante à acetilcolina (5µg/mL) em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, antes e 30 minutos após a ropivacaína (5,0µg/mL)	76
Gráfico 2. Amplitude (%) da resposta contraturante à acetilcolina (5µg/mL) em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, antes e 30 minutos após a levobupivacaína (5,0µg/mL)	78
Gráfico 3. Amplitude (%) da resposta contraturante à acetilcolina (5,0µg/mL) em preparação <i>biventer cervicis</i> de pintainho, antes e 30 minutos após a da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 (5,0µg/mL)	79
Gráfico 4. Efeito da ropivacaína (5,0 µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa a média ± desvio-padrão de cinco experimentos	81
Gráfico 5. Efeito da levobupivacaína (5,0 µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa a média ± desvio- padrão de cinco experimentos	82
Gráfico 6. Efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa a média ± desvio-padrão de cinco experimentos	83

RESUMO

Os anestésicos locais (AL) podem interagir com os bloqueadores neuromusculares (BNM) e modificar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, no entanto o mecanismo dessa interação é controverso. Este estudo experimental, realizado em preparações nervo frênico - hemidiafragma de rato e músculo *biventer cervicis* de pintainho, teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes AL na transmissão neuromuscular e sua influência no bloqueio produzido pelo pancurônio. Foram avaliados os seguintes parâmetros: efeito na transmissão neuromuscular dos AL (ropivacaína, levobupivacaína, mistura em excesso enantiomérico de bupivacaína) e do pancurônio empregados isoladamente; o bloqueio produzido pelo pancurônio em preparações previamente expostas aos AL; a eficácia da neostigmina e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio isoladamente e em preparações previamente expostas aos AL; a ação dos AL na resposta contraturante à 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, Wilcoxon, Anova, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Adotou-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Na preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato, os AL nas concentrações empregadas, não alteraram a amplitude das respostas musculares mas, potencializaram o efeito do pancurônio. O bloqueio neuromuscular foi parcial e totalmente revertido com a neostigmina e com a 4-aminopiridina, respectivamente. Não causaram alteração significativa nos potenciais de

membrana e produziram diminuição progressiva na amplitude e na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura. Na preparação *biventer cervicis* de pintainho os AL, com exceção da ropivacaína, promoveram diminuição na resposta contraturante da acetilcolina. Os resultados obtidos neste estudo demonstram um sinergismo entre os fármacos estudados, resultante das ações pré e pós-juncionais dos anestésicos locais.

ABSTRACT

Local anaesthetics (LA) may interact with neuromuscular blockers and modify their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. However, the mechanism of this interaction is controversial. This experimental study, conducted in rat phrenic nerve diaphragm preparations and chick biventer cervicis, aimed to evaluate the effect of different LA in neuromuscular transmission and its influence on pancuronium induced blockade. The following parameters were evaluated: the effect on neuromuscular transmission of LA (ropivacaine, levobupivacaine mixture enantiomeric excess bupivacaine) and pancuronium used in isolation; the blockade produced by pancuronium in preparations previously exposed to LA; the effectiveness of neostigmine and 4-aminopyridine in the reversal of neuromuscular blockade produced by pancuronium alone and in preparations previously exposed to LA; the action of LA in the contractile response to acetylcholine; its effects on membrane potentials and miniature endplate potentials. The results were expressed as means and standard deviations and analyzed using Student's t, Wilcoxon, ANOVA, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. A significance level of 5 % ($p < 0,05$) was adopted. In the rat phrenic nerve diaphragm preparation the LA, in the concentrations used, did not alter the amplitude of muscle response but potentiated the effect of pancuronium. Neuromuscular blockade was partially and fully reversed with neostigmine and 4-aminopyridine, respectively. There was no significant change in membrane potential and a progressive decrease in the amplitude and frequency of miniature endplate potentials was produced. In the chick biventer cervicis preparation the LA, with the exception of ropivacaine, led to a decrease in the contractile response to

acetylcholine. The results of this study demonstrate a synergistic effect between the drugs studied, resulting from prejunctional and postjunctional actions of LAs.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O mecanismo de ação dos anestésicos locais na transmissão neuromuscular e seus efeitos nos componentes sinápticos e eletrofisiológicos da célula nervosa ainda são alvo de pouca investigação, assim como, a influência destes fármacos no bloqueio neuromuscular produzido por diferentes bloqueadores neuromusculares (MATSUO et al, 1978; TABATABAI e BOOTH, 1990; LOYOLA et al, 2006a, LOYOLA et al, 2006b; BRAGA et al, 2009; CARVALHO et al, 2009). Na prática clínica, complicações ventilatórias no pós-operatório, decorrentes do bloqueio residual, constituem eventos frequentes e temidos pelos Anestesiologistas. É de grande importância conhecer a possibilidade da interação de bloqueadores neuromusculares com outros fármacos utilizados, simultaneamente, durante a anestesia, alterando a margem de segurança da transmissão neuromuscular e modificando os efeitos dos bloqueadores neuromusculares, uma vez que esta interação pode contribuir para a maior incidência de bloqueio residual e complicações nos pós-operatório. As implicações clínicas dessas interações tornam evidentes a necessidade de monitorização do bloqueio neuromuscular e de redução na dose destes fármacos, quando do uso simultâneo destes agentes (BRUCKNER et al, 1980; MUNHOZ et al, 2002; LOYOLA et al, 2006a; STOELTING e HILLIER, 2006a; BRAGA et al, 2009; CARVALHO et al, 2009; BRAGA et al, 2013; LIN e LIU, 2013).

Os anestésicos locais atuam, preferencialmente, nos canais de sódio voltagem-dependentes, interrompendo a condução neural por inibição do influxo de íons sódio, através de canais e poros iônicos nas membranas neuronais.

Normalmente, estes canais estão em estado de repouso, durante o qual os íons sódio estão impossibilitados de entrar. Bloqueiam os potenciais de ação responsáveis pela condução nervosa, reduzindo ou impedindo o grande e transitório aumento na permeabilidade das membranas excitáveis ao Na^+ (NEHER e STEINBACK, 1978; CATTERALL e MACKIE, 1996; JACOB, 1998; STOELTING e HILLIER, 2006a). Eles interagem com um ou mais locais de ligação específicos dentro do canal de sódio e interferem na permeabilidade da membrana. O anestésico local também pode deslocar o cálcio de um local próximo ao canal de Na^+ e, a seguir, bloquear o canal de Na^+ adjacente ou, em virtude de suas propriedades lipofílicas, incorporar-se à membrana celular, impedindo a abertura dos poros e, portanto, interferindo na passagem de eletrólitos (JACOB, 1998; ALVES e GUANAIS, 2002; MCLURE e RUBIN, 2005; STOELTING e HILLIER, 2006a).

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 lipoproteicos, 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, 2006a; MORGAN e MIKHAIL, 2013a).

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 apresenta na forma de aminas terciárias (raramente secundárias) e situam-se em duas categorias: amino-ésteres (procaína, tetracaína e cocaína) ou amino-amidas (lidocaína, bupivacaína, ropivacaína, mistura enantiomérica de bupivacaína e levobupivacaína). 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, 2006a; LIN e LIU, 2013; MORGAN e MIKHAIL, 2013a).

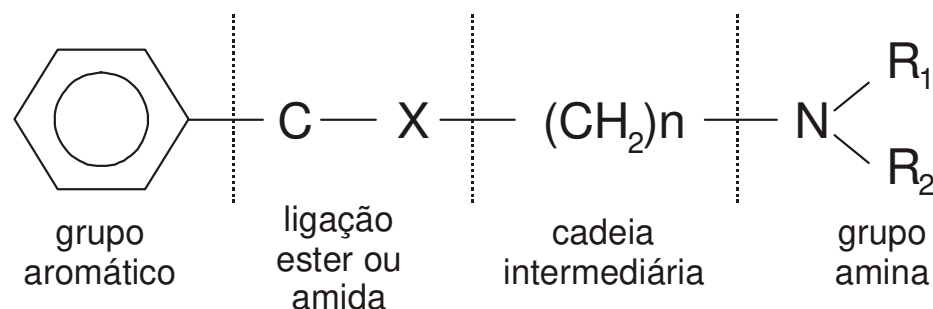


Figura 1. Estrutura molecular dos Anestésicos Locais (COVINO,1986)

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, e a adição do radical butil resultou em N-butil pipecolil-xilidida ou butil PPX – bupivacaína (EKËNSTRAM et al, 1957). A bupivacaína é comercializada como mistura racêmica, contendo dois isômeros ópticos: o enantiômero R (+) e o enantiômero S (-), com diferentes efeitos farmacológicos e toxicológicos.

A existência de dois isômeros ópticos, ou enantiômeros, resulta da configuração da fórmula estrutural. O composto butil pipecolil 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 três dimensões, com forma de uma “mão direita” ou de “mão esquerda” e que não se superpõem (SIMONETTI, 1995; SIMONETTI, 1997a; SIMONETTI, 1997b). 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 velocidade máxima de despolarização (V_{max}) e induzir um bloqueio frequência-dependente bastante pronunciado (ARACAVA et al, 1984; 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). Alguns autores demonstraram *in vitro* 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 com 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; STOELTING e HILLIER, 2006a). Atualmente, existem duas alternativas de enantiômeros puros relativamente seguras: a S (-) ropivacaína e a S(-) bupivacaína (levobupivacaína). Porém, apesar de apresentarem maior segurança devido a menor cardiotoxicidade, ambas exibem menor propriedade de produzir relaxamento muscular (DELFINO et al, 1999; GARCIA et al, 2001).

A ropivacaína (**Figura 2**) é puramente um enantiômero S (-), menos lipofílico que a bupivacaína racêmica, o que lhe confere um *clearance* maior e meia-vida de eliminação mais curta. Possui atividade vasoconstritora intrínseca potente, inerente à sua estrutura, não sendo formulada para uso subaracnóideo, pois poderia comprometer o fluxo sanguíneo medular. Age diretamente na vasculatura por ação vasoconstritora, diferente da cocaína, que age indiretamente inibindo a recaptura da norepinefrina nas fibras pós-ganglionares simpáticas, sendo, de fato, o único anestésico local simpatomimético. É muito utilizada em anestesia peridural, bloqueios periféricos e anestésias infiltrativas. A ropivacaína compartilha com a levobupivacaína S(-) a especificidade de bloquear fibras sensitivas com significativo aumento deste efeito, propriedade que justifica seu uso em analgesia pós-operatória, através da infiltração da ferida cirúrgica, particularmente em colecistectomias e herniorrafias (SIMONETTI, 1995; STOELTING e HILLIER, 2006a; MORGAN e MIKHAIL, 2013a).

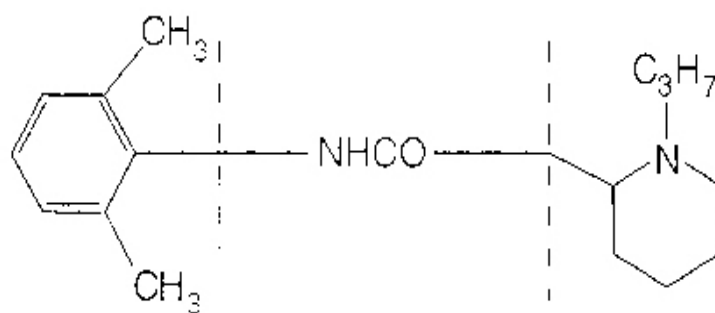


Figura 2. Estrutura molecular da ropivacaína (MORGAN e MIKHAIL, 2013a)

A levobupivacaína S (-) (**Figura 3**) é o enantiômero 100% (S-) puro da bupivacaína racêmica (S50-R50), com propriedades farmacológicas semelhantes às da ropivacaína, como menor lipossolubilidade, menor toxicidade sistêmica, maior bloqueio sensitivo e menor bloqueio motor em relação ao observado para a bupivacaína racêmica (STOELTING e HILLIER, 2006a; LIN e LIU, 2013; MORGAN e MIKHAIL, 2013a).

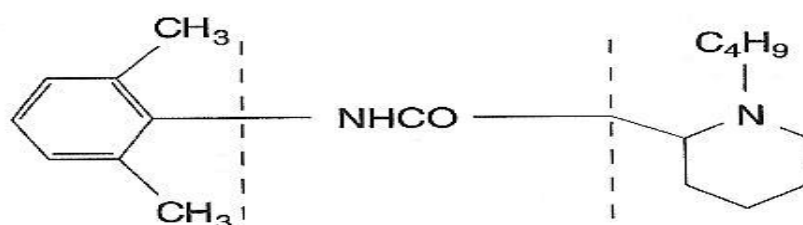
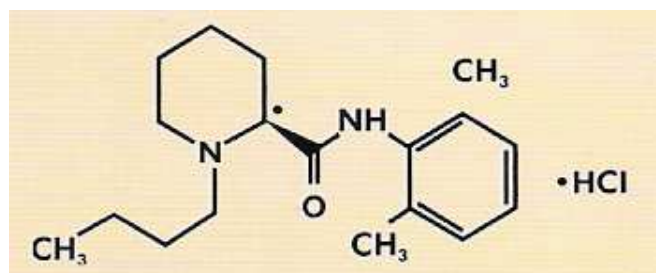


Figura 3. Estrutura molecular da levobupivacaína (MORGAN e MIKHAIL, 2013a)

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**). Embora produza anestesia comparável à formulação racêmica, a presença de apenas 25% do isômero R (+) bupivacaína contribui para a atividade anestésica deste fármaco, com menor risco de cardio e neurotoxicidade (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) (SIMONETTI, 2006)

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 estudo realizado em ratos, empregando preparação nervo ciático - músculo gastrocnêmico, foi observado 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 (S75:R25) significativamente mais potente do que os isômeros S (-) ou o R (+), quanto à capacidade de causar bloqueio motor (TRACHEZ et al, 2005).

O relaxamento muscular necessário para o procedimento cirúrgico pode ser obtido por anestesia regional, anestesia inalatória ou venosa profunda e por agentes bloqueadores neuromusculares (BNM). Em 1942, Harold Griffith publicou

os resultados de um estudo, onde foi utilizado um extrato refinado de curare (veneno da flexa dos índios sul-americanos) durante a anestesia. Os bloqueadores neuromusculares passaram, então, a fazer parte do arsenal de fármacos rotineiramente 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, 2006b; DONATI, 2013; MORGAN e MIKHAIL, 2013b).

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 adespolarizantes, 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 encontram-se a d-tubocurarina, a metocurina, o alcurônio, o atracúrio, o cisatracúrio, o mivacúrio e o doxacúrio, e no grupo dos aminoesteróides se destacam o rocurônio, pancurônio e o vecurônio (WAUD, 1984; HUNTER, 1995; SPARR et al, 2001; STOELTING e HILLIER, 2006b; DONATI, 2013; MORGAN e MIKHAIL, 2013b).

O pancurônio (**Figura 5**) é um bloqueador neuromuscular aminoesteróide não despolarizante de longa duração de ação, o que o torna indicado em cirurgias prolongadas e de grande porte. A sua estrutura química consiste em um anel

esteróide com duas moléculas de acetilcolina modificadas. É pouco metabolizado pelo fígado e seus metabólitos possuem alguma atividade bloqueadora neuromuscular. A excreção é primariamente renal (40%) e 10% pela bile. Possui efeitos cardiovasculares atribuídos a associação de bloqueio vagal e liberação de catecolaminas nos terminais nervosos adrenérgicos, devendo ser usado com cautela em doentes coronariopatas (STOELTING e HILLIER, 2006b; DONATI, 2013; MORGAN e MIKHAIL, 2013b).

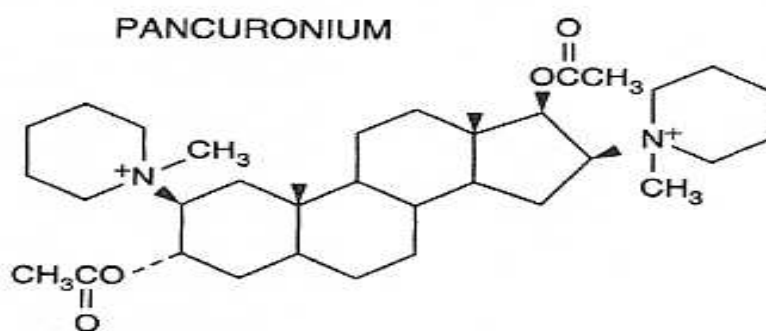


Figura 5. Estrutura molecular do pancurônio (MORGAN e MIKHAIL, 2013b).

O retorno da função neuromuscular normal, após a administração de bloqueadores neuromusculares, é de primordial importância, e a reversão do bloqueio tem como objetivo restaurar a atividade neuromuscular, particularmente, em relação à função pulmonar e à proteção das vias aéreas contra aspiração de conteúdo gástrico. Classicamente, o antagonismo do bloqueio neuromuscular adespolarizante é realizado com auxílio de fármacos anticolinesterásicos, como a

neostigmina, que atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase na junção neuromuscular, prejudicando a destruição normal da acetilcolina, que se acumula e compete com o bloqueador neuromuscular no receptor, restabelecendo a transmissão neuromuscular. Diferentemente dos anticolinesterásicos, as aminopiridinas, que também podem ser utilizadas na reversão do bloqueio neuromuscular adespolarizante, agem inibindo a condutância ao potássio, o que aumenta e prolonga o fluxo de cálcio para dentro da terminação nervosa motora com consequente aumento na liberação de acetilcolina (TELIVUO e KATZ, 1970; ULBRICHT e WAGNER, 1976; YEH et al, 1976; VITAL BRAZIL e FONTANA, 1982; BRAZIL et al, 1989; DONATI, 2013; MORGAN e MIKHAIL, 2013b).

Os efeitos diretos dos anestésicos locais sobre a placa mioneural ainda são questionados. No entanto, estudos apontam 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; MUNHOZ 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; BRAGA et al, 2009; CARVALHO et al, 2009 , SAHIN et al, 2011; BRAGA et al, 2013).

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 consequente diminuição na liberação da acetilcolina ou pode diminuir a sensibilidade da membrana pós-juncional para a acetilcolina (MATTHEWS e QUILLIAM, 1964; STEINBACH, 1968; USUBIAGA e STANDAERT, 1968; STRAUGHAN, 1971; MATSUO et al, 1978; BRAGA et al, 2009; CARVALHO et al, 2009).

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; BOWMAN, 1980; COHEN et al, 1980; RUFF, 1982; SINE e TAYLOR, 1982; ARACAVA et al, 1984; BOWMAN, 1994; LOYOLA et al, 2006a; MARTINS et al, 2007).

Alguns estudos experimentais e clínicos já demonstraram a potencialização dos efeitos de diferentes bloqueadores neuromusculares pelos anestésicos locais, assim como interferência na reversão do bloqueio promovido por esta associação

(TOFT et al, 1990; TAIVAINEN et al, 1994; LOYOLA et al, 2006a; BRAGA et al 2009; CARVALHO et al 2009; SAHIN et al, 2011).

Na prática clínica, é muito comum a associação de anestesia regional e anestesia geral, assim como outras técnicas anestésicas onde se utilizam anestésicos locais, que possam atingir níveis sanguíneos consideráveis para o comprometimento da transmissão neuromuscular. Portanto, é importante e necessária a realização de estudos, buscando investigar os prováveis mecanismos destas interações e respostas, que justifiquem a influência dos anestésicos locais nos efeitos dos bloqueadores neuromusculares. A constatação dessa interação é de extrema relevância, recomendando maior observação e monitorização dos efeitos dos bloqueadores neuromusculares, particularmente, quando do emprego simultâneo destes fármacos, ou em qualquer situação em que a margem de segurança da junção neuromuscular estiver prejudicada.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

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

2.2 Específicos

Avaliar:

1. os efeitos da ropivacaína, levobupivacaína e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) sobre a transmissão neuromuscular;

2. o grau do bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio isoladamente e em preparação previamente exposta aos anestésicos locais;

3. os efeitos da ropivacaína, levobupivacaína 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 ropivacaína, levobupivacaína e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) sobre a ação contraturante da acetilcolina.

5. a eficácia da neostigmina e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio isoladamente e em preparação previamente exposta aos anestésicos locais (ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados

Após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - IB - UNICAMP (Protocolo nº 2346-1 - 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:

ropivacaína - 5 µg/mL

levobupivacaína - 5 µg/mL

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

- Bloqueadores neuromusculares: pancurônio – 2 µg/mL
- Colinérgico: acetilcolina – 5 µg/mL
- Reversores: neostigmina – 2 µg/mL

4-aminopiridina – 20 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 (ropivacaína, levobupivacaína e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) na transmissão neuromuscular; o bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio isoladamente; a influência dos anestésicos locais no bloqueio neuromuscular causado pelo pancurônio; a reversão do bloqueio neuromuscular com a neostigmina e 4-aminopiridina.

A preparação foi montada de acordo com a técnica descrita por BULBRING (1946). Foram utilizados ratos com peso entre 250 e 300g, anestesiados com uretana (1,2 mg/kg, via intraperitoneal), seguido de exsanguinação por secção dos vasos do pescoço, para facilitar a identificação do nervo frênico esquerdo e retirada do hemidiafragma correspondente.

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- 1,9; água destilada 1000 mL.

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 40 mL de solução de Tyrode.

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

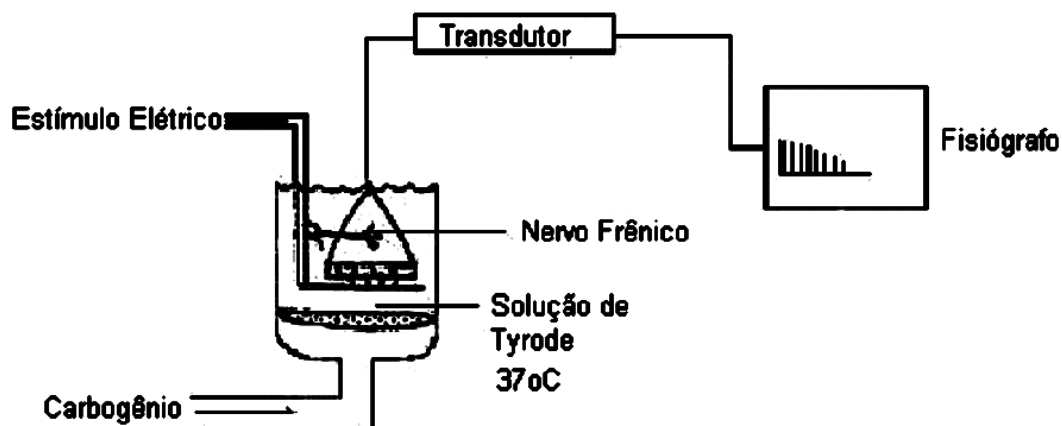


Figura 6. Esquema da preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

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

Os experimentos seguiram o seguinte protocolo: após a estabilização da preparação, iniciou-se estimulação elétrica do nervo frênico por 3 minutos e registro da resposta controle; adição dos anestésicos locais ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25), na concentração de 5 µg/mL; registro das respostas durante 60 minutos. O mesmo protocolo foi realizado para avaliar o bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio (2 µg/mL) empregado isoladamente. Foram utilizados cinco ratos diferentes para cada fármaco.

Nos experimentos em que se estudou a associação anestésico local - bloqueador neuromuscular, o pancurônio (2 µg/mL) foi adicionado à preparação após 30 minutos de exposição ao anestésico local, e as respostas registradas

durante 60 minutos. Foram também utilizados cinco animais diferentes para cada anestésico local. Para análise dos dados considerou-se a amplitude das respostas musculares antes e 60 minutos após a adição do bloqueador neuromuscular à preparação.

Para avaliação da eficácia da neostigmina (n=5) e a 4-aminopiridina (n=5) na reversão do bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio isoladamente e em preparação exposta aos anestésicos locais, estes fármacos foram adicionadas à preparação, após o registro do bloqueio neuromuscular obtido aos 60 minutos.

3.3.3 Influência dos anestésicos locais: ropivacaína, levobupivacaína 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 5 mL 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 1000 mL. 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=4) para a detecção da curva de acetilcolina (5 µg/mL) antes e depois da adição de cada anestésico local: ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) na concentração de 5 µg/mL. Com estimulador GRASS modelo S88, aplicaram-se estímulos indiretos supramaximais, com 0,1 Hz de frequência, 0,2 ms de duração e intensidade de 4 a 9 V. A tensão dada ao músculo foi de 0,5 g/cm. Foram estimulados durante 3 minutos para obtenção das respostas musculares (controle); após esse período, suspendeu-se a estimulação e adicionou-se na preparação a acetilcolina (5 µg/mL), registrando-se a curva resposta. Quando a contratura atingiu o seu ápice, interrompeu-se o registro do fisiógrafo e a preparação foi lavada com solução nutritiva de Krebs (três sucessivas lavagens), e os anestésicos locais ropivacaína, ou levobupivacaína, ou mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) na concentração de 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 (5 µg/mL), registrando-se a segunda curva. O grau de contratura à acetilcolina foi comparado antes e após a adição da ropivacaína, ou levobupivacaína, 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 o estudo 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, 1952), 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 (3 M), 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 pósterio-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 (3 M). 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**).

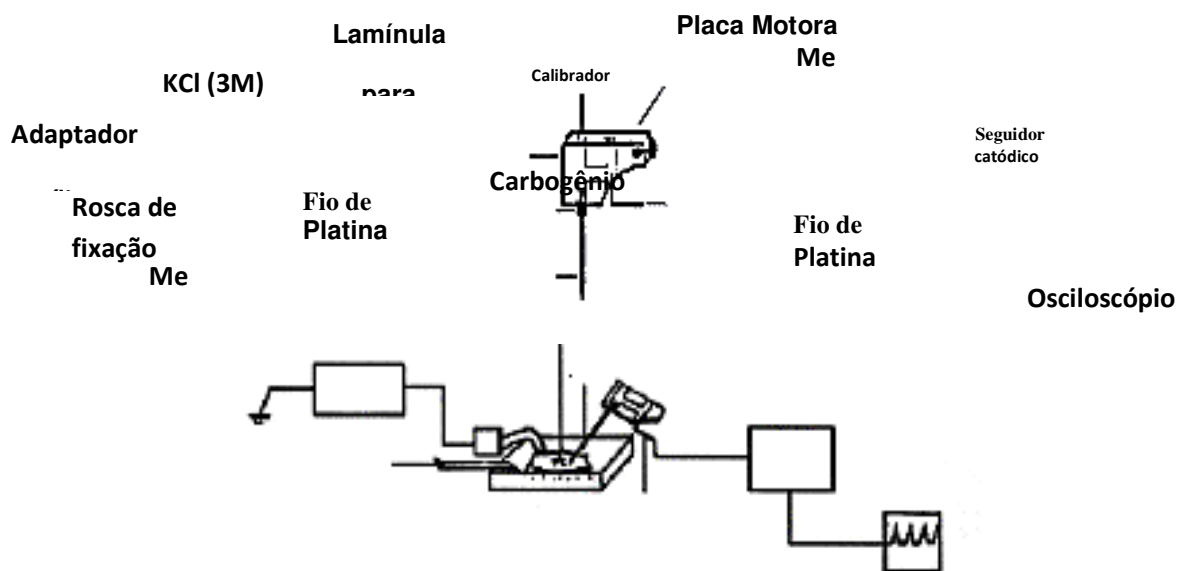


Figura 7. Microeletrodo e montagem de aparelhagem para os experimentos eletrofisiológicos

3.4.3 Influência dos anestésicos locais: ropivacaína, levobupivacaína 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 adição dos anestésicos locais. Após esta medida, adicionou-se ao banho, separadamente, a ropivacaína, a levobupivacaína ou a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) na concentração de 5 µg/mL 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: ropivacaína, levobupivacaína 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 ropivacaína, da levobupivacaína 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 dos anestésicos locais.

3.5 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como valores médios e desvios padrão. Utilizou-se o teste t de Student para: avaliar os efeitos dos anestésicos locais e do pancurônio na amplitude das respostas musculares (grau de bloqueio); comparar a amplitude das respostas musculares antes e após a adição da neostigmina e da 4-aminopiridina, utilizadas na reversão do bloqueio produzido pelo pancurônio isoladamente e em preparação exposta aos diferentes anestésicos locais; comparar a amplitude da resposta contraturante à acetilcolina antes e após a adição dos diferentes anestésicos locais. ANOVA para comparação entre os grupos, dos graus de bloqueio obtido com pancurônio em preparação exposta aos anestésicos locais; o teste Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação entre os três grupos dos efeitos dos anestésicos locais na resposta contraturante à acetilcolina em preparação *biventer cervicis* de pintainho e Mann-Whitney para

comparação entre dois grupos (ropivacaína X levobupivacaína; ropivacaína X S75-R25%; levobupivacaína X S75-R25%). Wilcoxon para análise dos potenciais de membrana nas fibras musculares. 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. RESULTADOS

4.1 Estudos Biológicos

4.1.1 Influência dos Anestésicos Locais (ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína) e do pancurônio nas respostas musculares em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

Os anestésicos locais (ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25), nas concentrações estudadas e empregadas isoladamente em preparação nervo frênico-diafragma de rato, não causaram redução na amplitude das respostas musculares à estimulação elétrica indireta. O pancurônio (2,0 µg/mL) empregado isoladamente produziu uma redução média de $54,9\% \pm 14,1$ na amplitude das respostas musculares (**Figuras 8 e 9**).

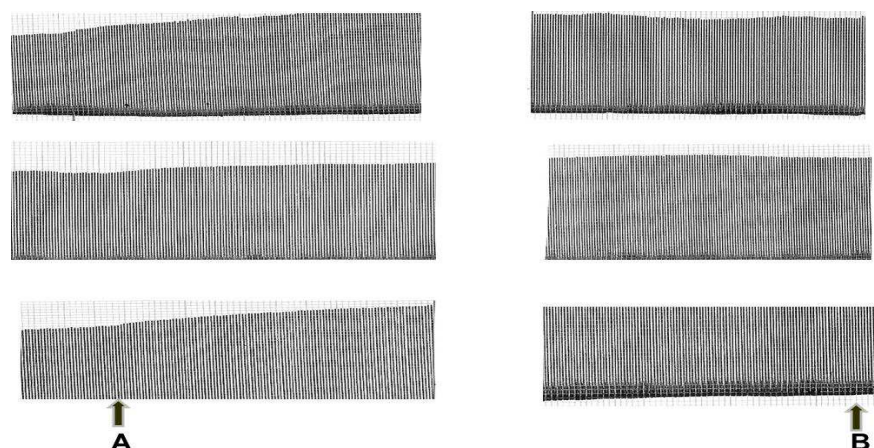


Figura 8. Efeito da ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1 Hz e duração de 0,2 ms), em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). **A:** adição do anestésico local (5,0 $\mu\text{g/mL}$); **B:** 60 minutos após a adição do anestésico local. Traçado superior (ropivacaína); traçado médio (levobupivacaína); traçado inferior (S75-R25)

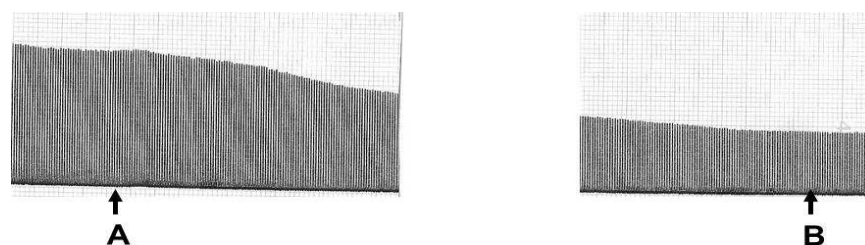


Figura 9. Efeito do pancurônio nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1 Hz e duração de 0,2 ms), em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). **A:** adição de pancurônio (2,0 $\mu\text{g/mL}$); **B:** 60 minutos após a adição de pancurônio

4.1.2 Influência dos Anestésicos Locais (ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) no bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

Os valores médios e desvios-padrão de bloqueio produzido pelo pancurônio (2,0µg/mL) em preparações previamente expostas à ropivacaína, levobupivacaína e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25, foram de 93,8 % $\pm$ 9,2, 90,2% $\pm$ 18,4 e 100%, respectivamente (**Figura 10 e Tabelas 6, 7 e 8**).

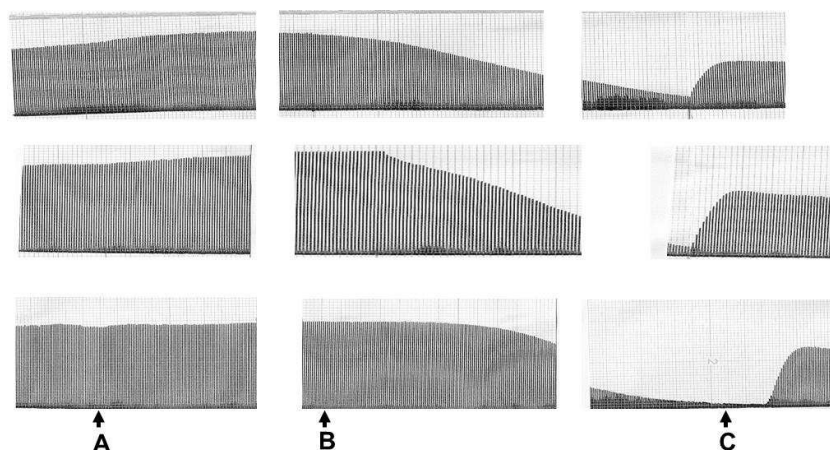


Figura 10. Efeito do pancurônio nas respostas musculares à estimulação indireta (frequência de 0,1 Hz e duração de 0,2 ms), em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5), previamente exposta à ropivacaína, levobupivacaína e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25. **A:** adição do anestésico local (5,0 µg/mL); **B:** adição do pancurônio (2,0 µg/mL) 30 minutos após exposição ao anestésico local; **C:** 60 minutos após a adição do pancurônio. Traçado superior (pancurônio + ropivacaína); traçado médio (pancurônio + levobupivacaína); traçado inferior (pancurônio + S75-R25)

A análise estatística mostrou diferença significativa entre o bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio empregado isoladamente e o bloqueio produzido nas preparações previamente expostas à ropivacaína ($p=0,0153$), levobupivacaína ($p=0,0317$) e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 ($p=0,002$) - (**Tabelas 6, 7 e 8**). A comparação entre os graus de bloqueio produzidos pelo pancurônio em associação aos diferentes anestésicos locais não mostrou diferença significativa ($p=0,4445$) – **Tabela 1**.

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão do bloqueio (%) produzido pelo pancurônio (2,0 µg/mL) em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato, previamente exposta à ropivacaína, levobupivacaina e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25, na concentração de 5,0 µg/mL

Fármacos	Bloqueio (%)	p
ropivacaína	93,8 ± 9,2	0,4445
levobupivacaína	90,2 ± 18,4	
bupivacaína (S75-R25)	100 ± 0	

ANOVA

4.1.3 Eficácia da neostigmina (2,0 μ g/mL) e 4-aminopiridina (20 μ g/mL), na reversão do bloqueio produzido pelo pancurônio isoladamente e pela associação pancurônio - anestésicos locais (ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25), em preparação nervo frênico - hemidiafragma de rato

O bloqueio neuromuscular causado pelo pancurônio isoladamente (**Figura 11**) e em preparações expostas à ropivacaína, levobupivacaína e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 foi parcial e totalmente revertido pela neostigmina e pela 4-aminopiridina, respectivamente (**Figuras 12 e 13**).

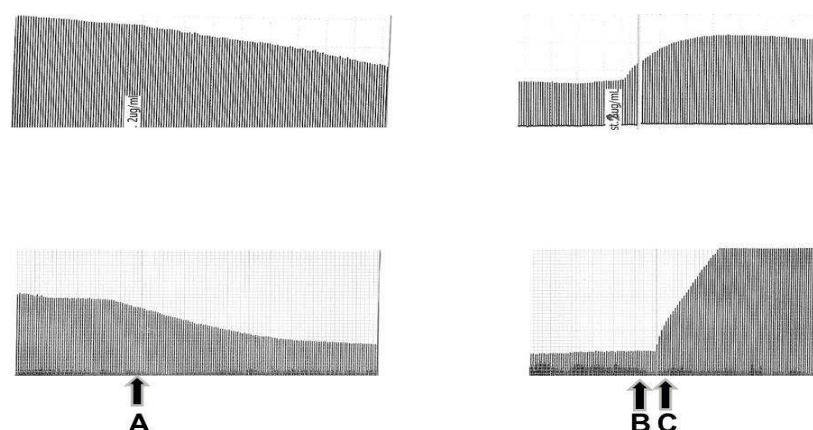


Figura 11. Efeito da neostigmina (2,0 μ g/mL) e da 4-aminopiridina (20 μ g/mL), na reversão do bloqueio produzido pelo pancurônio isoladamente, em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato (n=5). **A:** adição do pancurônio (2,0 μ g/mL); **B:** 60 minutos após adição do pancurônio; **C:** adição da neostigmina (traçado superior) e da 4-aminopiridina (traçado inferior)

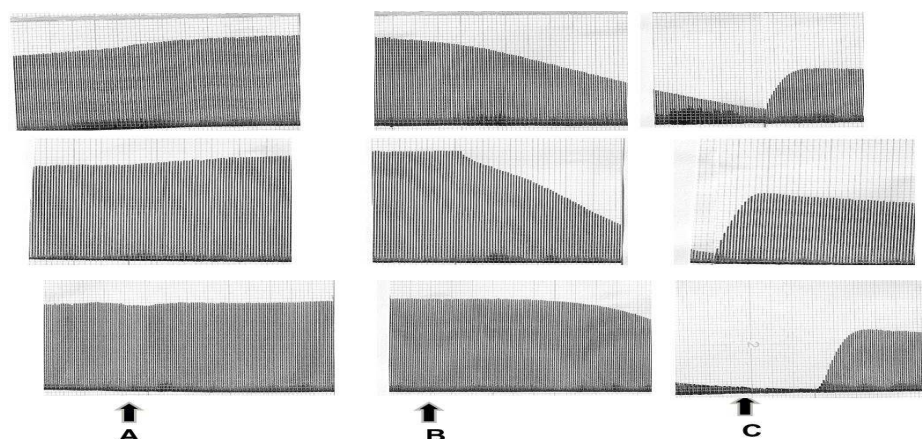


Figura 12. Efeito da neostigmina na reversão do bloqueio produzido pelo pancurônio em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato ($n=5$) previamente exposta a ropivacaína (traçado superior), levobupivacaína (traçado médio) e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 (traçado inferior). **A:** adição do anestésico local ($5,0 \mu\text{g/mL}$); **B:** 30 minutos após adição do anestésico local e adição do pancurônio ($2,0 \mu\text{g/mL}$); **C:** 60 minutos após adição do pancurônio e reversão com neostigmina ($2,0 \mu\text{g/mL}$)

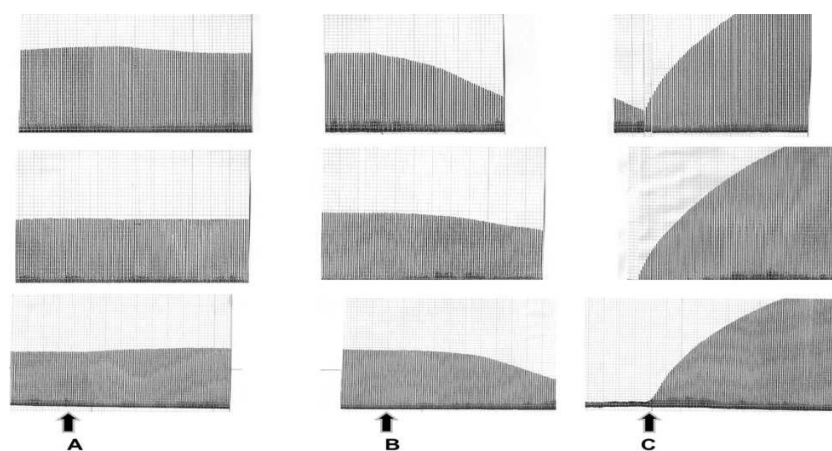


Figura 13. Efeito da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio produzido pelo pancurônio em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato ($n=5$) previamente exposta à ropivacaína (traçado superior), levobupivacaína (traçado médio) e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 (traçado inferior). **A:** adição do anestésico local ($5,0 \mu\text{g/mL}$); **B:** 30 minutos após adição do anestésico local e adição do pancurônio ($2,0 \mu\text{g/mL}$); **C:** 60 minutos após adição do pancurônio e reversão com 4-aminopiridina ($20 \mu\text{g/mL}$)

A amplitude das respostas musculares após a adição da neostigmina e 4-aminopiridina, nas preparações expostas ao pancurônio isoladamente, foi de $92,95\% \pm 12,4$ e 100% , respectivamente (**Tabelas 9 e 10**).

Nas preparações previamente expostas à ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25, a amplitude das respostas após a neostigmina foi, respectivamente, $82,0\% \pm 25,0$; $75,6\% \pm 10,2$ e $83,3\% \pm 6,8$ (**Tabelas 11,12 e 13**). Nas diferentes associações a amplitude das respostas foi de 100% , após a adição da 4-aminopiridina (**Tabelas 14,15 e 16**). A eficácia da neostigmina e da 4-aminopiridina na recuperação da amplitude das resposta musculares foi significativa.

4.1.4 Influência dos Anestésicos Locais (ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) na ação contraturante da acetilcolina. Preparação *biventer cervicis* de pintainho

Na preparação *biventer cervicis* de pintainho, a ropivacaína ($5,0 \mu\text{g/mL}$) adicionada à preparação, 30 minutos antes da acetilcolina ($5 \mu\text{g/mL}$), promoveu diminuição de $16,07\% \pm 6,01$ (**Tabela 17**) na amplitude da resposta a acetilcolina. Não houve diferença significativa, quando comparada à resposta da acetilcolina antes e após a adição de ropivacaína ($p= 0,1250$) **Figura 14 e Gráfico 1**.

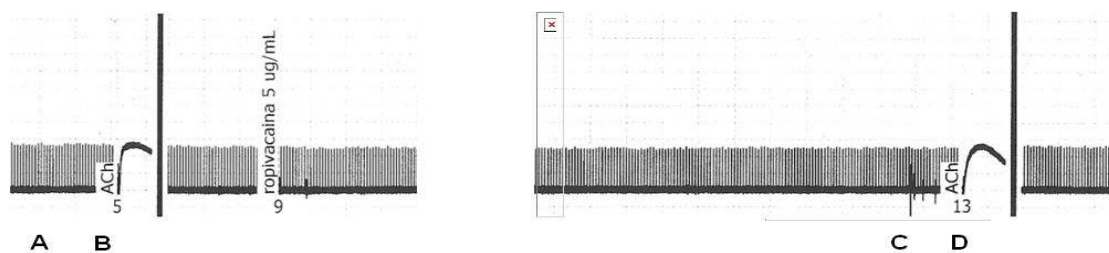


Figura 14. Registro miográfico do efeito da ropivacaína (5,0 µg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5 µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho (n=4), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1Hz e duração 0,2 ms). **A:** controle; **B:** adição de acetilcolina; **C:** 30 minutos após a adição de ropivacaína **D:** adição de acetilcolina

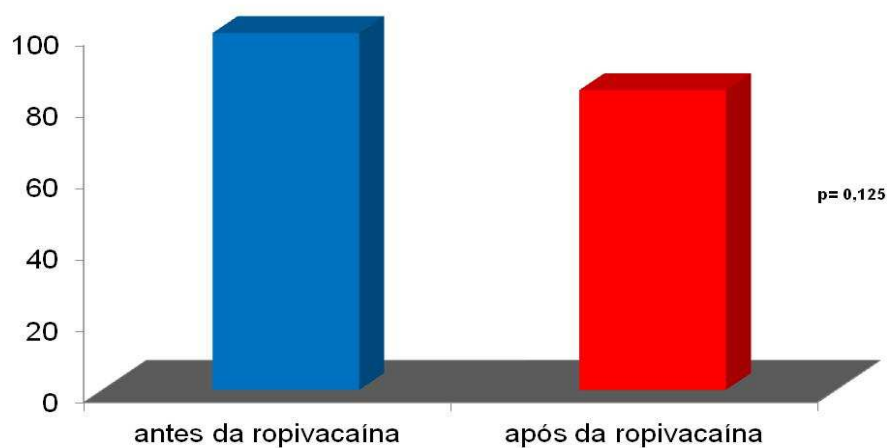


Gráfico 1. Amplitude (%) da resposta contraturante à acetilcolina (5 µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a ropivacaína (5,0 µg/mL)

Nas preparações expostas à levobupivacaína (5,0 µg/mL) e à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25, houve uma diminuição na amplitude da curva contraturante de acetilcolina de $19,35\% \pm 3,67$ e $33,12\% \pm 11,51$, respectivamente, (**Tabelas 18 e 19**), com diferença estatisticamente significativa ($p=0,0018$ e $0,0104$) em relação à resposta controle (**Figuras 15 e 16, Gráficos 2 e 3**).

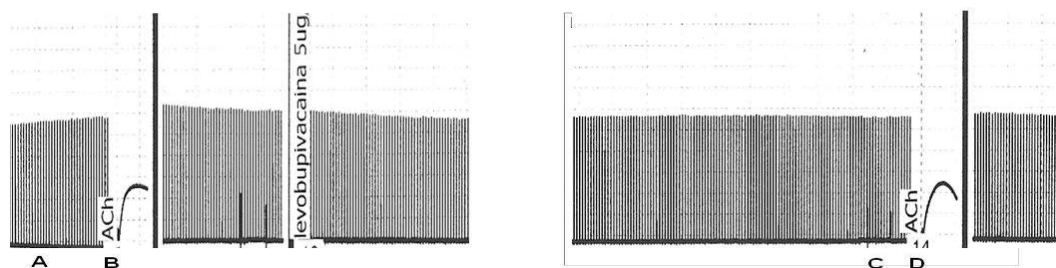


Figura 15. Registro miográfico do efeito da levobupivacaína (5,0 µg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5 µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho (n=4), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1 Hz e duração 0,2 ms). **A:** controle; **B:** adição de acetilcolina; **C:** 30 minutos após a adição de levobupivacaína, **D:** adição de acetilcolina

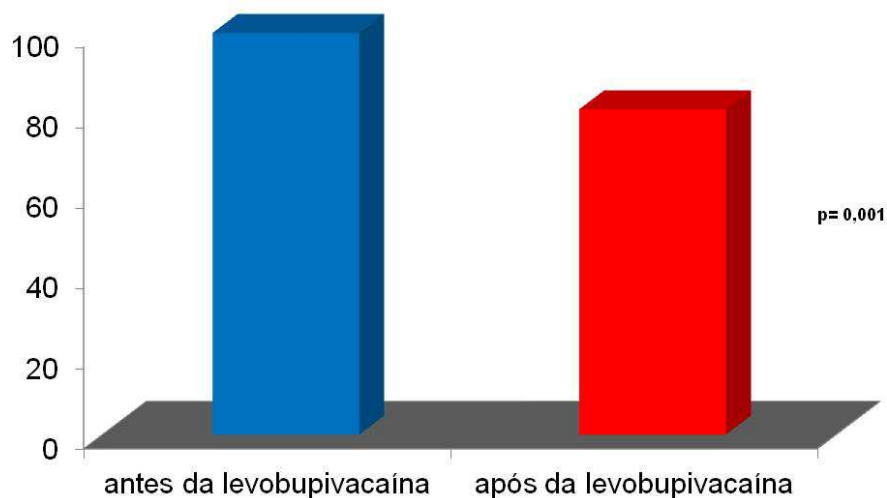


Gráfico 2. Amplitude (%) da resposta contraturante à acetilcolina (5 µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a levobupivacaína (5,0 µg/mL)

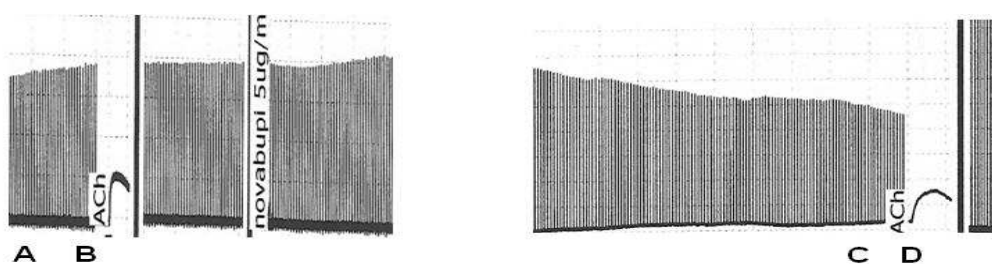


Figura 16. Registro miográfico do efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 (5,0 µg/mL) sobre a ação contraturante da acetilcolina (5,0 µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho (n=5), sob estimulação elétrica indireta (frequência 0,1 Hz e duração 0,2 ms). **A:** controle; **B:** adição de acetilcolina; **C:** 30 minutos após a adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25; **D:** adição de acetilcolina

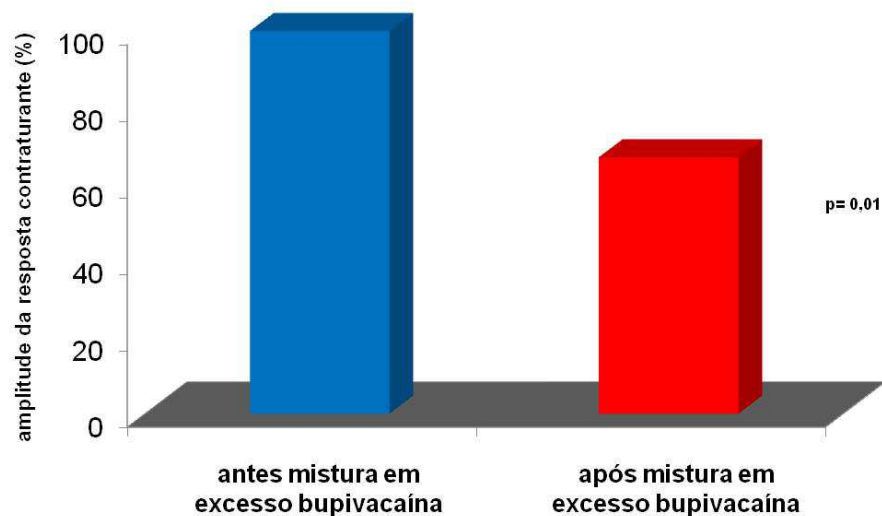


Gráfico 3. Amplitude (%) da resposta contraturante à acetilcolina (5,0 µg/mL) em preparação *biventer cervicis* de pintainho, antes e 30 minutos após a da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 (5,0 µg/mL)

A comparação entre o efeito dos três anestésicos locais estudados na resposta contraturante à acetilcolina, mostrou diferença significativa ($p=0,026$). Não houve diferença significativa entre a ropivacaína e a levobupivacaína ($p=0,24$). A comparação dos efeitos da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25 na resposta contraturante à acetilcolina mostrou diferença significativa em relação aos observados com a levobupivacaína ($p=0,0329$) e com a ropivacaína ($p=0,04$) - **Tabela 2.**

Tabela 2. Valores médios e desvios-padrão do percentual de redução (%) da resposta contraturante à acetilcolina (5 µg/mL), produzido pelos anestésicos locais (ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína – (S75-R25), em preparação *biventer cervicis* de pintainho

Fármacos	Bloqueio (%)	p
ropivacaína	16,07 ± 6,01	0,0260
levobupivacaína	19,35 ± 3,67	
bupivacaína (S75-R25)	33,12 ± 11,51	

ANOVA por Kruskal Wallis

teste de Mann-Whitney: tabela 17 X 18 (p = 0,2444)

tabela 17 X 19 (p = 0,0400)

tabela 18 X 19 (p = 0,0329)

4.2 Estudos Eletrofisiológicos

4.2.1 Influência dos Anestésicos Locais (ropivacaína, levobupivacaína e 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 (**Tabelas 3, 4 e 5; Gráficos 4, 5 e 6**).

Tabela 3. Valores médios e desvios-padrão do potencial de membrana (mV) nas fibras musculares de diafragma de rato expostas à ropivacaína (5 µg/mL)

Tempo (min)	Potencial medido em mV ($\bar{x} \pm DP$)	Comparação com o controle pelo teste Wilcoxon pareado
0	80,28±1,57	Controle
10	79,56 ± 1,80	Não significativo
20	77,52 ± 1,96	Não significativo
30	76,68 ± 1,65	Não significativo
40	76,76 ± 1,46	Não significativo
50	76,40 ± 1,62	Não significativo
60	77,20 ± 1,48	Não significativo

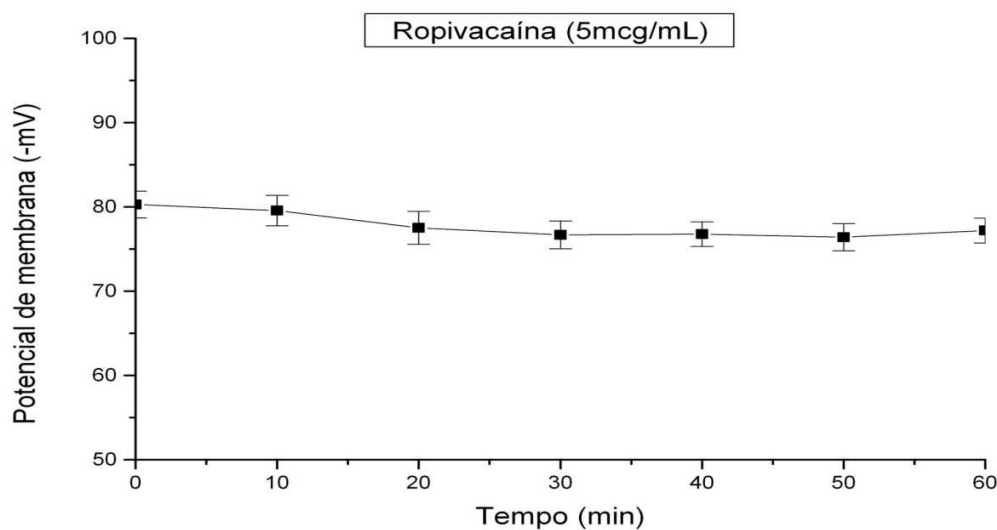


Gráfico 4. Efeito da ropivacaína (5,0 µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa a média ± desvio-padrão de cinco experimentos

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

Tempo (min)	Potencial medido em mV ($\bar{x} \pm DP$)	Comparação com o controle pelo teste Wilcoxon pareado
0	79,60 $\pm$ 2,08	Controle
10	80,00 $\pm$ 2,01	Não significativo
20	77,30 $\pm$ 1,08	Não significativo
30	80,24 $\pm$ 1,92	Não significativo
40	80,12 $\pm$ 2,16	Não significativo
50	77,20 $\pm$ 2,08	Não significativo
60	78,24 $\pm$ 1,32	Não significativo

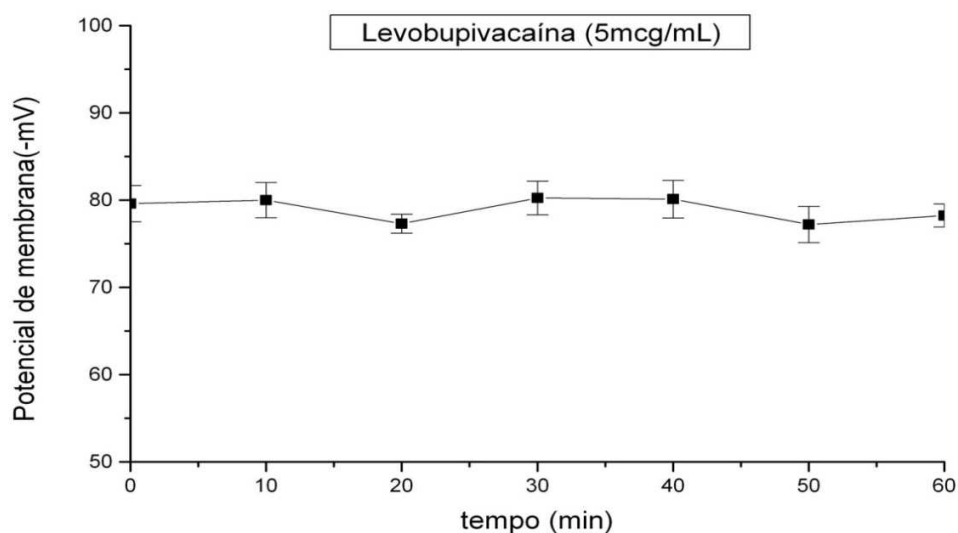


Gráfico 5. Efeito da levobupivacaína (5,0 µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio-padrão de cinco experimentos

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 (5,0 µg/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

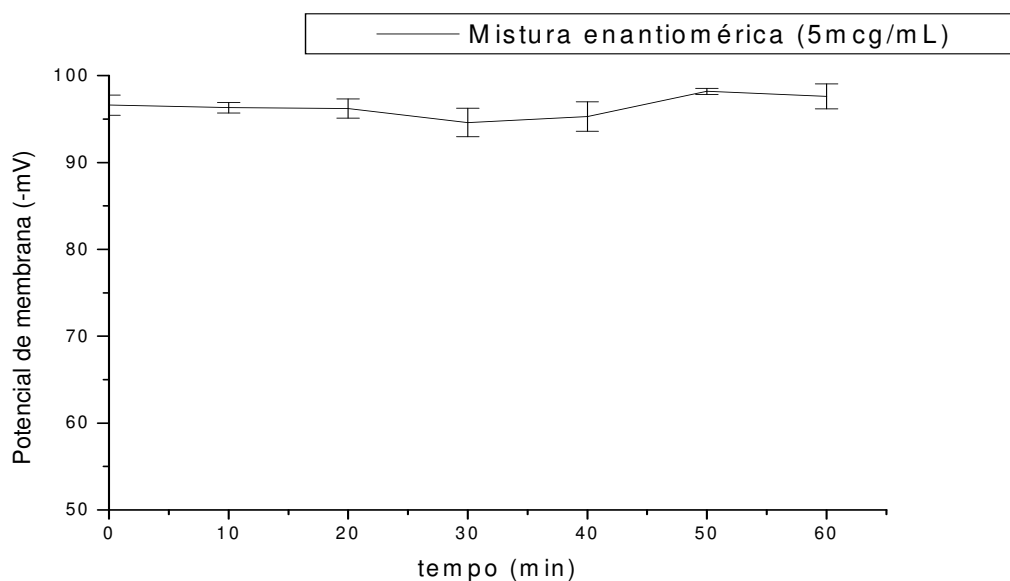


Gráfico 6. Efeito da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (5,0 µg/mL) sobre o potencial de membrana (mV), nas fibras musculares de diafragma de rato. Cada ponto representa a média $\pm$ desvio-padrão de cinco experimentos

4.2.2 Influência dos Anestésicos Locais (ropivacaína, levobupivacaína e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína - S75-R25) nos Potenciais de Placa Terminal em Miniatura (PPTM)

Na concentração estudada, os anestésicos locais causaram diminuição progressiva da frequência e da amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura, até o bloqueio observado aos 60 minutos da adição do fármaco (**Figura 17**).

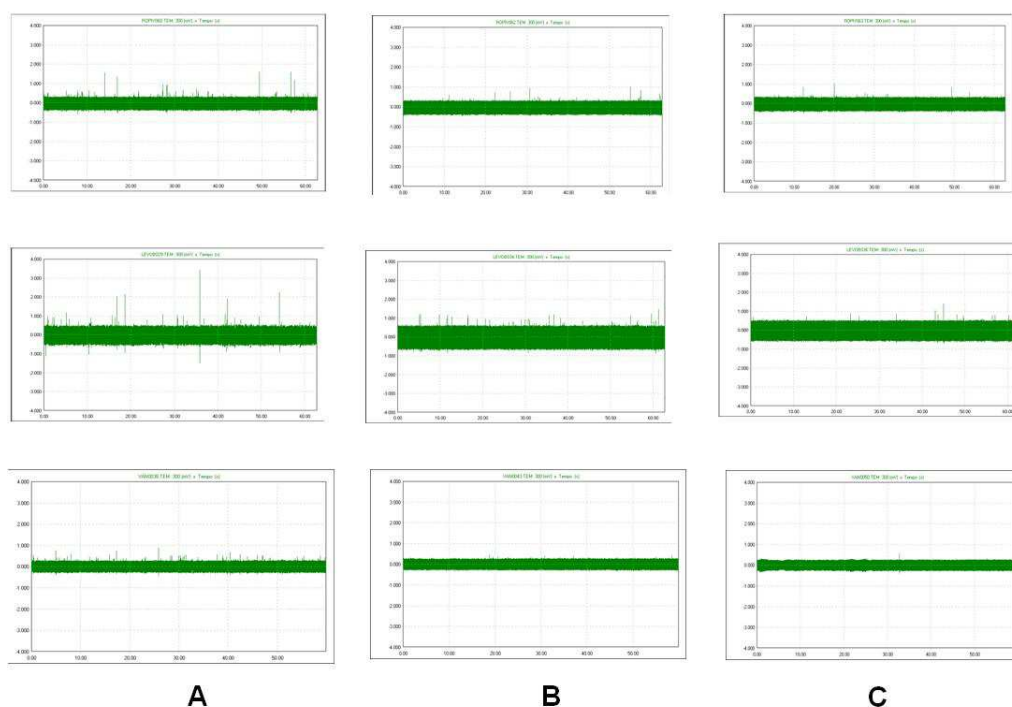


Figura 17. Efeitos da ropivacaína (traçado superior), levobupivacaína (traçado médio) e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (traçado inferior) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação diafragma de rato. **A:** antes da adição do anestésico local (controle); **B:** 30 minutos após a adição do anestésico local; **C:** 60 minutos após a adição do anestésico local

5. DISCUSSÃO

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 bupivacaína racêmica, a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína, a ropivacaína e a levobupivacaína pertencem à classe das amino-amidas, mas por apresentarem maior potência e maior duração de ação em relação à lidocaína, vem sendo bastante utilizadas em anestesia regional (STOELTING e HILLIER, 2006a; MORGAN E MIKHAIL, 2013a).

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).

A bupivacaína racêmica, a mistura enantiomérica de bupivacaína, a ropivacaína, a levobupivacaína 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).

Há evidências de interação entre anestésicos locais e bloqueadores neuromusculares, fármacos comumente empregados na prática clínica, com consequente modificação das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas destes, podendo ser observados efeitos indesejáveis durante e após a realização de procedimentos cirúrgicos, quando do uso simultâneo dos mesmos (MATSUO et al, 1978; BRUCKNER et al, 1980; TOFT et al, 1990; TAIVAINEN et al, 1994; MARTINS e MARTINS, 1997; SPACEK e KRESS, 1998; HAYWOOD et al, 1999; 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; SAHIN et al, 2011).

Ensaio clínico descrevem que os anestésicos locais empregados por via peridural podem interagir e potencializar os efeitos dos bloqueadores neuromusculares, quando do uso combinado de bloqueio espinhal e anestesia

geral (TOFT et al, 1990; TAIVAINEN et al, 1994; MUNAKATA et al, 2004; SUZUKI et al, 2007; SAHIN et al, 2011).

No entanto, embora estes efeitos tenham sido demonstrados, experimentalmente, em preparações isoladas e em 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; BRAGA et al, 2009; CARVALHO et al, 2009; SAHIN et al, 2011).

Ainda existem controvérsias em relação aos mecanismos responsáveis por esta interação. É descrito que esta é multifatorial e pode ser devida a diferentes mecanismos: na região pré-sináptica, deprimem seletivamente a condução nas fibras motoras e inibem a liberação da acetilcolina durante a estimulação nervosa; na região pós-sináptica, os anestésicos locais podem se ligar a diferentes sítios específicos de acetilcolina, resultando em dessensibilização de receptores, além de poder ocasionar oclusão temporária de canais dos receptores nicotínicos e estabilização da membrana pós-juncional, não sendo excluída a interferência com o mecanismo de excitação-contração da fibra muscular (USUBIAGA e STANDAERT, 1968; STRAUGHAN, 1971; MATSUO et al, 1978; NEHER e STEINBACH, 1978; SINE e TAYLOR, 1982; LOYOLA et al, 2006a; SUZUKI et al, 2007; BRAGA et al, 2009; CARVALHO et al, 2009; SAHIN et al, 2011).

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 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.

Neste trabalho, observamos que em preparação nervo frênico-diafragma de rato, a ropivacaína, a levobupivacaína 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 pancurônio 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; BRAGA et al, 2009; CARVALHO et al, 2009; SAHIN et al, 2011). Ao contrário, BARASH et al (2009) descreveram efeito bloqueador neuromuscular dos anestésicos locais, assim como potencialização do bloqueio neuromuscular produzido por bloqueadores neuromusculares despolarizantes e competitivos.

Estudo realizado em preparação similar à empregada neste trabalho, para avaliar a influência da procaína, lidocaína e etidocaína, no bloqueio produzido pela d-tubocurarina, os autores 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, concluíram que a interação bloqueadores neuromusculares - anestésicos locais pode ser devido à potencialização verdadeira causada pela ação dos dois tipos de fármacos em diferentes sítios da junção neuromuscular (MATSUO et al, 1978).

Em nosso meio, resultados semelhantes foram encontrados por LOYOLA et al (2006a e 2006b), que 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. Em 2009, BRAGA et al e CARVALHO et al evidenciaram que a lidocaína, a bupivacaína racêmica e a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína, empregadas isoladamente, não exerceram efeitos na junção neuromuscular; no entanto, potencializaram o bloqueio produzido pelo rocurônio, em preparação nervo frênico - diafragma de rato.

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 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 observada por outros autores, que estudaram, em diafragma de rato, os efeitos

da procaína, da lidocaína, da bupivacaína racêmica e da mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (LOYOLA et al, 2006a; LOYOLA et al, 2006b; BRAGA et al, 2009; CARVALHO et al, 2009).

Para avaliar a ação pré-sináptica dos anestésicos locais e sua interferência nos processos de produção ou liberação do mediador, foi estudada a influência desses fármacos nos potenciais de placa terminal em miniatura, também denominados minipotenciais de placa. Constituem pequenos potenciais de amplitude correspondente à centésima parte do potencial de placa terminal, cuja função é desconhecida, mas parece estar relacionada à manutenção do trofismo muscular. Esses eventos eletrofisiológicos 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 (FATT e KATZ, 1952).

Como descrito anteriormente por BRAGA et al, e CARVALHO et al, (2009), com outros anestésicos locais, observou-se prejuízo na liberação do neurotransmissor, evento demonstrado pela diminuição progressiva da frequência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura. Portanto, estes resultados podem sugerir que a ropivacaína, a levobupivacaína e a mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína possuem ação pré-sináptica.

Adicionalmente, para esclarecer a potencialização do pancurônio pelos anestésicos locais, neste estudo buscou-se avaliar uma provável ação pós-sináptica dos anestésicos locais. Empregou-se a preparação *biventer cervicis*

de pintainho, pois a musculatura de aves, por possuir uma alta densidade de receptores colinérgicos nicotínicos, possibilita, através da análise da curva-resposta à acetilcolina, identificar a afinidade de fármacos nos receptores pós-juncionais e evidenciar a ação pós-sináptica dos anestésicos locais (GINSBORG e WARRINER, 1960; BOWMAN, 1980; BOWMAN, 1994).

Os resultados observados indicam que os anestésicos locais estudados nestas concentrações, com exceção da ropivacaína, reduziram a resposta contraturante à acetilcolina, eventos também confirmados por Braga et al (2009) que estudaram a lidocaína e a mistura em excesso enantiomérico da bupivacaína. A diminuição da resposta contraturante à acetilcolina pode inferir mecanismo competitivo entre a levobupivacaína e a mistura enantiomérica com o neurotransmissor, resultados demonstrados por UETA et al (2006), que estudaram *in vitro* a atividade antagonista da bupivacaína racêmica e de seus dois isômeros 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 antagonizavam a atividade destes receptores de maneira similar e concentração dependentes. Nos experimentos com a preparação *biventer cervicis* de pintainho não foram observadas contraturas musculares, resultados contrários aos de WALI (1984) que relatou contratura na musculatura da ave ocasionada pela lidocaína. Esse efeito pode dever-se a um aumento na liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático (WALI, 1984). 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.

A ropivacaína é um anestésico local singular em sua estrutura e em efeitos farmacológicos. Constitui anestésico local com propriedade vasoconstritora intrínseca devido à sua estrutura propilpipecolililidida e por ser um enantiômero puro (S-). Esta característica também faz com que a ropivacaína promova um intenso bloqueio diferencial, ou seja, o fármaco atua mais nas fibras sensitivas do que nas fibras motoras (SIMONETTI, 1995). Esta propriedade inerente à ropivacaína pode ser um dos fatores responsáveis pela ausência de ação significativa na região pós-sináptica.

A estrutura e as características físico-químicas destes anestésicos locais podem constituir fatores determinantes para os diferentes efeitos. A maior potência anestésica pode ser atribuída à maior hidrofobicidade destes 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, parecem 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. Fato que explica o maior bloqueio motor com a bupivacaína racêmica e com a mistura em excesso enantiomérico de bupivacaína, em relação à ropivacaína e à levobupivacaína.

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.

O bloqueio neuromuscular produzido pela associação anestésicos locais e pancurônio foi total e parcialmente revertido pela 4-aminopiridina e neostigmina, respectivamente. Outros estudos experimentais também mostraram que o bloqueio neuromuscular, resultante da combinação de bloqueadores neuromusculares e anestésicos locais, foi só parcialmente revertido pela neostigmina e efetivamente antagonizado pela 4-aminopiridina (MATSUO et al, 1978; LOYOLA et al, 2006a). Resultado semelhante foi

observado em ensaio clínico por SAHIN et al (2011), que demonstraram maior eficácia da 4-aminopiridina em relação à neostigmina, empregadas na reversão do bloqueio ocasionado pelo vecurônio em pacientes submetidos à bloqueio epidural com levobupivacaína. Outros autores que avaliaram clinicamente a eficácia da neostigmina na reversão do bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio isoladamente, e quando do emprego simultâneo da bupivacaína administrada por via epidural, mostraram que o tempo para reversão do bloqueio neuromuscular foi significativamente mais prolongado nos pacientes submetidos à anestesia geral associada a bloqueio espinhal (TOFT et al, 1990).

A neostigmina, ao inibir a acetilcolinesterase, aumenta a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica, sendo capaz de deslocar competitivamente os agentes causadores do bloqueio. O antagonismo parcial pela neostigmina reforça esse achado, uma vez que os anticolinesterásicos são eficazes apenas na reversão do bloqueio pós-sináptico. A 4-aminopiridina, além do efeito inibidor de dessensibilização de receptores nicotínicos da placa terminal, provoca aumento quantal de acetilcolina. Esse aumento é resultante de ações na membrana das terminações nervosas, como a inibição dos canais de potássio, que produz aumento na duração do potencial de ação e o maior influxo de íons cálcio para as terminações nervosas motoras, durante a despolarização da membrana (ULBRICHT e WAGNER, 1976; HARVEY e MARSHALL, 1977a; HARVEY e MARSHALL, 1977b; SAHIN et al, 2011). O antagonismo completo obtido com a 4-aminopiridina sugeriu que a interação dos anestésicos locais com o pancurônio tem componente pré-sináptico,

relacionado à diminuição da liberação de acetilcolina, mas, também, podem causar bloqueio de canal aberto dos colinoreceptores pós-sinápticos.

A evidência desta interação, já demonstrada na clínica e embasada em estudos experimentais, que têm como vantagem a possibilidade de eliminar um viés, que é a grande variabilidade individual de resposta aos bloqueadores neuromusculares, particularmente os não-despolarizantes, enfatiza a necessidade de observação cuidadosa e do uso frequente de monitorização da transmissão neuromuscular, quando do emprego simultâneo desses agentes, ou em situações em que a margem de segurança da transmissão neuromuscular estiver reduzida.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

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

1. não comprometeram a transmissão neuromuscular, mas potencializaram o bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio;

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 contraturante à acetilcolina, com exceção da ropivacaína.

5. o bloqueio neuromuscular causado pela associação anestésicos locais e pancurônio foi parcialmente e totalmente revertido pela neostigmina e pela 4-aminopiridina respectivamente.

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS*

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.

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.

Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, Cahalan MK, Stock MC – Anesthetic Agents, adjuvants, and drug interaction. In: Barash PG, *Clinical Anesthesia*, 6th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Bussiness 2009. p.514-515.

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.

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 - Anestesicos 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, 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.

Braga AFA, Carvalho VH, Braga FS, Rodrigues-Simioni L, Loyola YC, Potério GB - Influence of local anesthetics on the neuromuscular blockade produced by rocuronium: effects of lidocaine and 50% enantiomeric excess bupivacaine on the neuromuscular junction. Rev Bras Anesthesiol. 2009;59(6):725-34.

Braga AFA, Braga FS, Potério GB, Frias JA, Pedro FMS, Munhoz DC - Influence of hypnotics on cisatracurium-induced neuromuscular block. Use of Acceleromyography. Rev Bras Anesthesiol. 2013;63(3):249-253.

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.

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

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.

Carvalho VH, Braga Ade F, Braga FS, Loyola YC, Araújo DR, Mantovani M - The influence of lidocaine and racemic bupivacaine on neuromuscular blockade produced by rocuronium. A study in rat phrenic nerve-diaphragm preparation. *Acta Cir Bras* 2009;24:211-215.

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.

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

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.

Donati F - Neuromuscular Blocking Agents. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, Cahalan MK, Stock MC; Ortega R. *Clinical Anesthesia*, 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2013, p. 523-560.

Ekénstram 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.

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

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.

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

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

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, Galve 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.

Lin YI, Liu SS - Local Anesthetics. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, Cahalan MK, Stock MC; Ortega R. *Clinical Anesthesia*, 7th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins 2013, p. 561-579.

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 Anesthesiol*, 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.

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.

McLure HA, Rubin AP - Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol* 2005;71:59-74.

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 - Local Anesthetics. In: Morgan GEJ, Mikhail MS – *Clinical Anesthesiology*. 5^{ed}. Lange, 2013a. p.263-276.

Morgan GEJ, Mikhail MS - Neuromuscular Blocking Agents. In: Morgan GEJ, Mikhail MS – *Clinical Anesthesiology*. 5^{ed}. Lange, 2013b. p.199-222.

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.

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.

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.

Sahin SH, Colak A, Sezer A, Arar C, Sevdı S, Gunday I, et al - Effect of epidural levobupivacaine on recovery from vecuronium-induced neuromuscular block in patients undergoing lower abdominal surgery. *Anaesth Intensive Care* 2011;39:607-610.

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 - Local Anesthetics. In: Stoelting RK, Hillier SC. Pharmacology & Physiology in Anesthetic Practice. Philadelphia: Lippincott Williams Wilk, 2006a. p 179-207.

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

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

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.

Tabatabai M, Booth AM - Mechanism of action of local anesthetics on synaptic transmission in the rat. *Anesth Analg*. 1990; 71(2):149-57.

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.

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

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.

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.

Ulbricht W, Wagner HH - Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. *Pflugers Arch* 1976; 367:77-87.

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

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.

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.

Yanagitate 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.

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

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

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

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1.



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

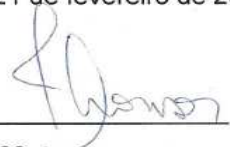
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto **"Influência dos anestésicos locais na transmissão neuromuscular e no bloqueio produzido pelo pancurônio e cisatracúrio. Estudo experimental."** (protocolo nº **2346-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Angélica de Fátima Assunção Braga / Vanessa Henriques Carvalho**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **21 de fevereiro de 2011**.

Campinas, 21 de fevereiro de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

8.2 ANEXO 2. COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

RESOLUÇÃO Nº 592, DE 26 DE JUNHO DE 1992

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

Princípios éticos na experimentação animal

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

Postula-se:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8.3 ANEXO 3 ARTIGO PUBLICADO NA ACTA CIRURGICA BRASILEIRA

5 – ORIGINAL ARTICLE
ANESTHESIA

Evidence of presynaptic and postsynaptic action of local anesthetics in rats¹

Angélica de Fátima de Assunção Braga¹, Vanessa Henriques Carvalho^{II}, Franklin Sarmento da Silva Braga^{III}, Gloria Maria Braga Potério^{III}, Filipe Nadir Caparica Santos^{IV}

^IAssociate Professor, Department of Anesthesiology, Campinas State University (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil. Intellectual, scientific, content and design of the study; acquisition and interpretation of data; technical procedures; manuscript writing; critical revision.

^{II}Master in Pharmacology, School of Medicine, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Intellectual, scientific, content and design of the study; acquisition and interpretation of data; technical procedures; manuscript writing; critical revision.

^{III}Assistant Professor, Department of Anesthesiology, School of Medicine, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Critical revision.

^{IV}Resident, Department of Anesthesiology, School of Medicine, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Acquisition and interpretation of data.

ABSTRACT

PURPOSE: To assess the probable actions of ropivacaine, 50% enantiomeric excess bupivacaine mixture (S75-R25) and levobupivacaine on neuromuscular transmission *in vitro*.

METHODS: Thirty rats were distributed into groups (n=5) according to the drug used: ropivacaine, bupivacaine (S75-R25) and levobupivacaine. The concentration used for the three local anesthetics (LA) was 5 µg.mL⁻¹. The following parameters were evaluated: 1) LA effects on membrane potential (MP) and miniature end plate potential (MEPP). A chick *biventer cervicis* preparation was also used to evaluate LA effects on the contracture response to acetylcholine.

RESULTS: LA did not alter MP values and decreased the frequency and amplitude of MEPP. In a chick *biventer cervicis* preparation, bupivacaine (S75-R25) and levobupivacaine decreased the contracture response to acetylcholine with statistical significance, in comparison to ropivacaine.

CONCLUSIONS: In the concentrations used, levobupivacaine and bupivacaine (S75-R25) exhibited presynaptic and postsynaptic actions evidenced by alterations in miniature end plate potentials and contracture response to acetylcholine. Ropivacaine only had a presynaptic action.

Key words: Anesthetics, Local. Bupivacaine. Rats.

Introduction

The mechanism of action of local anesthetics and their effects on synaptic transmission have not yet been fully elucidated. Furthermore, the effects of local anesthetics on the electrophysiological properties of the nerve cell body have also not been investigated in detail. Some authors have studied the iontophoretic effects of procaine on spinal motoneurons in cats submitted to orthodromic stimuli, and observed suppression of neuronal spike potential without alteration in excitatory postsynaptic potential and membrane resistance¹. Other authors, using the dorsal root ganglion isolated from frog spinal cords, confirmed the depressant action of procaine in the generation of spike potential to direct stimulation of ganglion cells². Tabatabai *et al.*³ studied the effects of lidocaine and racemic bupivacaine on the presynaptic and postsynaptic components of synaptic transmission of the rat sympathetic ganglion and observed blockade in various stages of synaptic transmission. The effects of these drugs on membrane potentials and miniature end plate potentials were studied in rats and interference at some phase of neuromuscular transmission was described^{4,5}.

The aim of this study was to evaluate the probable mechanisms of action of ropivacaine, 50% enantiomeric excess bupivacaine S75-R25 mixture and levobupivacaine on neuromuscular transmission in experimental models.

Methods

This is an *in vitro* experimental study. The procedures used are in compliance with the ethical principles for animal experimentation, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (BCAE) and were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Institute of Biology of the State University of Campinas (protocol n° 2346-1).

To evaluate the effects of ropivacaine, 50% enantiomeric excess bupivacaine mixture and levobupivacaine on miniature end plate potentials and membrane potentials, a phrenic nerve-rat diaphragm preparation was used, according to methodology proposed by Bulbring⁶.

Thirty male Wistar rats (weight range: 180 - 250g) were used. Animals were anesthetized with urethane (1.2mg.kg⁻¹, by intraperitoneal injection), exsanguinated by severance of major blood vessels in the neck to facilitate the identification and removal of the left hemidiaphragm and portion of the corresponding phrenic nerve. The preparations were fixed in a vat containing 40 mL of Tyrode nutrient solution, constantly aerated with carbogen

(95% O₂ + 5% CO₂) and maintained at 37°C. To evaluate local anesthetic effects on miniature end plate potentials and membrane potentials, the following groups were formed, according to the local anesthetic added to the preparation: Group I - ropivacaine; Group II - 50% enantiomeric excess bupivacaine mixture; Group III - levobupivacaine. In all groups, local anesthetic concentration was 5.0 µg.mL⁻¹.

To evaluate postsynaptic events of local anesthetics, a chick *biventer cervicis* preparation was used, mounted according to methodology described by Ginsborg and Warriner.⁷ Twelve chicks aged four to eight days, weighing from 40 to 80g, anesthetized with halothane by inhalation, followed by the removal of the *biventer cervicis* muscle, which was suspended in a 5ml-tub containing Krebs nutrient solution. The preparation was aerated with carbogen and temperature was maintained at 37°C. Experiments were performed (n=4) for the detection of the acetylcholine curve (5g.mL⁻¹) before and 30 minutes after the addition of each local anesthetic: ropivacaine, 50% enantiomeric excess bupivacaine mixture and levobupivacaine, in the same concentration used in rat experiments (5 µg.mL⁻¹). Indirect stimulation of skeletal muscles was performed with supramaximal pulses (duration: 0.2 ms; frequency: 0.1Hz). Responses to acetylcholine were recorded by a Gould RS 3400 chart recorder, before and 30 minutes after the addition of ropivacaine, 50% enantiomeric excess bupivacaine mixture and levobupivacaine.

Local anesthetic effects were evaluated on: 1) membrane potentials (MP) and miniature end plate potentials (MEPP); 2) contracture response to acetylcholine.

Statistical analysis

Results were expressed as means and standard deviations. For analysis of membrane potential of muscle fibers and contracture response to acetylcholine, Wilcoxon's test and Student's t-test for paired samples were used. A significance level of 5% was adopted ($p < 0.05$). The power of the test was calculated, obtaining $b > 20\%$ (power $> 80\%$).

Results

Ropivacaine, 50% enantiomeric excess bupivacaine mixture and levobupivacaine in the concentrations studied, caused no significant alterations in membrane potentials. The effects of local anesthetics on miniature end plate potentials (MEPP) are initially characterized by a decrease in frequency and amplitude, observed 30 minutes after drug addition, followed by blockade in

60 minutes.

In the chick biventer cervicis preparation, the percentages of decrease in the contracture response to acetylcholine, caused by the local anesthetics ropivacaine, 50% enantiomeric excess bupivacaine mixture and levobupivacaine in the concentration studied (5mg.mL^{-1}) were $16.07\% \pm 6.01$; $33.12\% \pm 11.51$ and $19.35\% \pm 3.67$, respectively. This reduction was significant with 50% enantiomeric excess bupivacaine and levobupivacaine ($p=0.01$), in comparison to ropivacaine ($p = 0.12$).

Discussion

Local anesthetics are a group of drugs that are widely used by different routes of administration, such as topical, subcutaneous infiltration, blockade of peripheral nerves and neuraxial anesthesia (spinal and epidural), in the prevention and relief of acute and chronic pain^{8,9}. Because LA are amphiphilic molecules, they have high affinity for excitable cell membranes, inactivating voltage-gated sodium channels, and thus preventing the influx of ions necessary for membrane depolarization. It is believed that a decrease in membrane permeability to sodium ions occurs by two mechanisms: general alterations in membrane fluidity with conformational changes in protein-voltage-gated-sodium channel and/or by the specific interaction between local anesthetics and sodium channels¹⁰⁻¹². On the other hand, a direct correlation between hydrophobicity and anesthetic potency indicates that nonspecific partition of a large quantity of local anesthetic in the lipid bilayer is important to facilitate access of the molecule to voltage-gated sodium binding sites¹³⁻¹⁴.

The enantiomeric bupivacaine mixture, ropivacaine, mepivacaine, racemic bupivacaine and levobupivacaine, commonly contain a chiral center in the piperidine ring, providing optic isomers with S (-) and R (+) configurations, a stereoisometry that may also contribute to cell membrane fluidity¹².

Theoretically, these agents may interfere in some phase involved in neuromuscular transmission. Local anesthetics selectively depress motor fiber conduction and reduce the release of acetylcholine during nerve stimulation by presynaptic action¹⁵⁻¹⁷. These drugs may bind to different specific acetylcholine sites, resulting in desensitization of these receptors by postsynaptic action. Furthermore, they may temporarily occlude nicotinic receptor channels¹⁸⁻²⁰.

There is no evidence that LAs inhibit the synthesis of acetylcholine, but in low concentrations these agents interfere with miniature end plate potential. Thus, impairment in quantal release of acetylcholine and alterations in miniature end plate potential may

manifest a presynaptic action. To evaluate local anesthetic action on presynaptic and postsynaptic sites, electrophysiological studies have been conducted. These experiments detect the spontaneous release of one quantum of acetylcholine and may investigate the influence of drugs used in the presynaptic region, due to its interference in the processes of mediator production or release. The postjunctional effect may be attributed to interference with the receptor occupied by the transmitter and the reduced sensitivity of the postjunctional membrane to acetylcholine^{16-17,19-20}.

In electrophysiological studies, similarly to other studies^{4-5,22}, we observed that local anesthetics did not produce alterations in the membrane potential of muscle fibers in the concentration employed, and potential is maintained within normal limits. According to descriptions by others authors²¹ it can be inferred that these drugs do not possess a depolarizing action on the muscle fiber. Their mechanism of action on the neuromuscular junction is not related to stabilizing activity of the muscle membrane. However, local anesthetics prevent the conduction of propagated action potentials, without affecting membrane potential.

The small amount of acetylcholine, ineffective to trigger an action potential, is continuously and spontaneously released and does not require electrical neural stimulation. This release is responsible for small amplitude potentials, corresponding to one hundredth the amplitude of the end-plate potential produced, named plate minipotentia or miniature end plate potentials. The function of miniature end plate potential is unknown, but seems to be related to the maintenance of muscle trophism²². The study of MEPPs is important to investigate the presynaptic effects of the drugs used, due to its interference in mediator release²². In contrast to previous reports on lidocaine^{4-5,21}, describing that it initially increases MEPP frequency, the local anesthetics used in the study caused a progressive decrease both in the frequency and amplitude of these potentials until complete blockade.

In the postsynaptic membrane, local anesthetics are capable of binding to specific areas of nicotinic receptors, different from specific areas of acetylcholine, promoting desensitization of these receptors^{18,23}.

LA effects were also evaluated in the chick *biventer cervicis* preparation. Due to the high density of nicotinic cholinergic receptors present in bird muscles, the response to acetylcholine permits us to evaluate the affinity of these drugs to these receptors in the postsynaptic region. The results observed in this preparation indicate that different local anesthetics in the concentrations used, reduced the contracture response induced by acetylcholine, and are similar to those previously described by

Braga *et al.*⁵. These authors found a significant decrease in the response to acetylcholine in preparations exposed to lidocaine and enantiomeric excess bupivacaine mixture.

Conclusions

The results suggest a presynaptic action, with modifications in quantal release of acetylcholine and a postsynaptic action in nicotinic receptors, preventing or decreasing neurotransmitter action, and not an effect on muscle fibers. Therefore, there seems to be a curaremimetic action, with a probable action on the neuromuscular junction, particularly the motor nerve ending.

References

- Curtis DR, Phillis JW. The action of procaine and atropine on spinal neurons. *J Physiol.* 1960;153:17-34.
- Aceves J, Machne X. The action of calcium and of local anesthetics on nerve cells, and their interaction during excitation. *J Pharmacol Exp Ther.* 1963;140:138-48.
- Tabatabai M, Booth AM. Mechanism of action of local anesthetics on synaptic transmission in the rat. *Anesth Analg.* 1990;71(2):149-57.
- Loyola YC, Braga Ade F, Potério GM, Sousa SR, Fernandes SC, Braga FS. Influence of lidocaine on the neuromuscular block produced by rocuronium: study in rat phrenic-diaphragmatic nerve preparation. *Rev Bras Anesthesiol.* 2006;56(2):147-56.
- Braga Ade F, Carvalho VH, Braga FS, Rodrigues-Simioni L, Loyola YC, Potério GB. Influence of local anesthetics on the neuromuscular blockade produced by rocuronium: effects of lidocaine and 50% enantiomeric excess bupivacaine on the neuromuscular junction. *Rev Bras Anesthesiol.* 2009;59(6):725-34.
- Bulbring E. Observation on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol.* 1946;1:38-61.
- Ginsborg BL, Warriner J. The isolated chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. *Br J Pharmacol Chemother.* 1960;15:410-1.
- Covino BG. Pharmacology of local anaesthetic agents. *Br J Anaesth.* 1986;58(7):701-16.
- Yanagidate F, Strichartz GR. Bupivacaine inhibits activation of neuronal spinal extracellular receptor-activated kinase through selective effects on ionotropic receptors. *Anesthesiology.* 2006;104(4):805-14.
- Ragsdale DS, Avoli M. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998;26(1):16-28.
- 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(1):134-41.
- Mizogami M, Tsuchiya H, Harada J. Membrane effects of ropivacaine compared with those of bupivacaine and mepivacaine. *Fundam Clin Pharmacol.* 2002;16(4):325-30.
- dePaula E, Schreier S. Molecular and physicochemical aspects of local anesthetic-membrane interaction. *Braz J Med Biol Res.* 1996;29(7):877-94.
- Schreier S, Malheiros SV, de Paula E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1508(1-2):210-34.
- Hirst GD, Wood DR. On the neuromuscular paralysis produced by procaine. *Br J Pharmacol.* 1971;41(1):94-104.
- Matthews EK, Quilliam JP. Effects of central depressant drugs upon acetylcholine release. *Br J Pharmacol Chemother.* 1964;22:415-40.
- Usubiaga JE, Standaert FJ. The effects of local anesthetics on motor nerve terminals. *Pharmacol Exp Ther.* 1968;159(2):353-61.
- Sine SM, Taylor P. Local anesthetics and histrionicotoxin are allosteric inhibitors of the acetylcholine receptor. Studies of clonal muscle cells. *J Biol Chem.* 1982;257(14):8106-4.
- Neher E, Steinbach JH. Local anaesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J Physiol.* 1978;277:153-76.
- Ruff RL. The kinetics of local anesthetic blockade of end-plate channels. *Biophys J.* 1982;37(3):625-31.
- Carvalho VH, Braga Ade F, Braga FS, Loyola YC, de Araújo DR, Mantovani M. The influence of lidocaine and racemic bupivacaine on neuromuscular blockade produced by rocuronium. A study in rat phrenic nerve-diaphragm preparation. *Acta Cir Bras.* 2009;24(3):211-5.
- Fatt P, Katz B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol.* 1952;117:109-28.
- Martins TD, Loyola YC, Braga Ade F. Influence of procainamide on the neuromuscular blockade caused by rocuronium and investigation on the mechanism of action of procainamide on the neuromuscular junction. *Rev Bras Anesthesiol.* 2007;57(1):74-82.

Correspondence:

Angélica de Fátima de Assunção Braga
Rua Dr. José Bonifácio Coutinho Nogueira, 225/61 Torre D
13091-611 Campinas – SP Brasil
Tel.: (55 19)3521-9560
franklinbraga@terra.com.br

Received: July 23, 2013

Review: Sept 20, 2013

Accepted: Oct 22, 2013

Conflict of interest: none

Financial source: none

¹Research performed at Department of Anesthesiology and Pharmacology, School of Medicine, Campinas State University (UNICAMP), Campinas-SP, Brazil.

8.4 ANEXO 4. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO – REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Your Submission

DE "Brazilian Journal of Anesthesiology" <rba@rba.com.br>

Para: franklinbraga@terra.com.br

Data: hoje 09:37

Ms. Ref. No.: BJAN-D-13-00202R1 Title: Efeito da associação ropivacaina-pancurônio na transmissão neuromuscular. Eficácia da neostigmine e 4-aminopiridina na reversão do bloqueio. Estudo experimental
Brazilian Journal of Anesthesiology

Cara Dra Angelica Assuncao Braga,

Informo-lhe que seu trabalho "Efeito da associação ropivacaina-pancurônio na transmissão neuromuscular. Eficácia da neostigmine e 4-aminopiridina na reversão do bloqueio. Estudo experimental" **foi aceito** para publicação na **Revista Brasileira de Anestesiologia/ Brazilian Journal of Anesthesiology**.

Obrigado por submeter seu trabalho à Revista Brasileira de Anestesiologia/
Brazilian Journal of Anesthesiology.

Atenciosamente,

Mario J Da Conceicao
Editor-Chefe Revista Brasileira de Anestesiologia/
Brazilian Journal of Anesthesiology

Efeito da associação ropivacaina-pancurônio na transmissão neuromuscular. Eficácia da neostigmine e 4-aminopiridina na reversão do bloqueio. Estudo experimental.

Angélica de Fátima de Assunção Braga^I, Vanessa Henriques Carvalho^{II}, Franklin Sarmento da Silva Braga^{III}, Gloria Maria Braga Potério^{IV}, Filipe Nadir Caparica Santos^V.

I Associate Professor, Department of Anesthesiology, UNICAMP, Campinas-SP, Brazil. Responsible for the intellectual and scientific content of the study, data acquisition and interpretation, manuscript preparation and writing, critical revision, protocol design, was involved in the technical procedures and supervision of all phases of the study.

II Master's Degree in Pharmacology, UNICAMP School of Medicine, São Paulo, Brazil. Responsible for the intellectual and scientific content of the study, data acquisition and interpretation, manuscript preparation and writing, critical revision, protocol design, was involved in the technical procedures and supervised all phases of the study.

III Assistant Professor, Department of Anesthesiology, UNICAMP School of Medicine, São Paulo, Brazil. Advisor and Critical revision.

IV Associate Professor, Department of Anesthesiology, UNICAMP School of Medicine, São Paulo, Brazil. Advisor and Critical revision.

V Resident, Department of Anesthesiology, UNICAMP School of Medicine, São Paulo, Brazil. Responsible for data acquisition and interpretation.

1 Research performed in the Department of Anesthesiology and Pharmacology, Campinas State University (UNICAMP) School of Medicine, São Paulo, Brazil.

Resumo

Justificativa e Objetivos - Os efeitos dos anestésicos locais na junção neuromuscular e sua influência no bloqueio produzido por bloqueadores neuromusculares não-despolarizantes é ainda alvo de pouca investigação, no entanto esta interação tem sido descrita em trabalhos experimentais e em humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro*, a interação da ropivacaína com o pancurônio, a influência na transmissão e bloqueio neuromuscular e a efetividade da neostigmina e 4-aminopiridina na reversão do bloqueio.

Método - Ratos foram distribuídos em grupos ($n = 5$) de acordo com o fármaco estudado: ropivacaína ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$); pancurônio ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$); ropivacaína + pancurônio. A neostigmina e a 4-aminopiridina foram usadas nas concentrações de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Avaliou-se: 1) efeitos da ropivacaína sobre o potencial de membrana (PM) e potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM); 2) a amplitude das respostas do diafragma antes e 60 minutos após a adição da ropivacaína; o grau de bloqueio neuromuscular com o pancurônio e com a associação pancurônio – ropivacaína; 3) a efetividade da neostigmina e 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular.

Resultados - A ropivacaína não alterou a amplitude das respostas musculares, os PM, mas diminuiu a frequência e a amplitude dos PPTM. O bloqueio produzido pelo pancurônio foi potencializado pela ropivacaína, e parcial e totalmente revertido pela neostigmina e 4-aminopiridina, respectivamente.

Conclusões - A ropivacaína potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio. O antagonismo completo com a 4-aminopiridina sugere ação pré-sináptica da ropivacaína.

Unitermos: Anestésicos Locais, Ropivacaina; Bloqueadores neuromusculares, Não-Despolarizantes, pancurônio. Animais, Ratos.

INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais, particularmente as amino-amidas, constituem um grupo de fármacos amplamente utilizados por diferentes vias de administração, tais como: tópica, infiltração subcutânea, bloqueio de nervos periféricos, anestesia neuroaxial isoladamente ou em associação a anestesia geral¹⁻⁴.

Existem evidências que estes fármacos podem interferir na transmissão neuromuscular e potencializar os efeitos dos bloqueadores neuromusculares¹⁻⁷.

A ropivacaína é um anestésico local amino-amida com propriedades físico-químicas semelhantes à bupivacaína (S50-R50%), excetuando a menor potência e o menor grau de bloqueio motor, com maior seletividade por fibras nervosas sensitivas, características atribuídas a menor lipossolubilidade e a sua estrutura de isômero puro S⁻ em oposição à mistura racêmica da bupivacaína^{8,9}.

Estas características também são responsáveis pela menor toxicidade cardíaca e no sistema nervoso central, vantagens apresentadas pela ropivacaína sobre a bupivacaína (S50-R50%)^{8,9}. O pancurônio é um bloqueador neuromuscular não-despolarizante, aminoesteróide, de longa duração de ação, fato que justifica seu uso em cirurgias prolongadas e em terapia intensiva¹⁰.

O objetivo deste estudo foi avaliar, em modelo experimental, o efeito da ropivacaína na transmissão neuromuscular, a sua influência no bloqueio neuromuscular produzido pelo pancurônio e a eficácia de neostigmine e 4-aminopiridina na reversão do bloqueio.

MÉTODO

Trata-se de estudo experimental *in vitro* e os procedimentos usados estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (protocolo nº 2346-1).

Foram utilizados ratos machos de linhagem Wistar, com peso entre 180 - 250g. Os animais foram anestesiados com uretana (1,2mg.kg⁻¹, via intraperitonal), e em seguida foram exsanguinados por

secção dos vasos do pescoço, para facilitar a identificação e retirada do hemidiafragma esquerdo e a porção do nervo frênico correspondente. Para avaliação do efeito da ropivacaína sobre a transmissão neuromuscular, sua influência no bloqueio produzido pelo pancurônio e a efetividade da neostigmine e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular foi utilizada a técnica descrita por Bulbring¹¹. As preparações foram fixadas em cuba contendo 40 mL de solução nutritiva de Tyrode, aeradas constantemente com carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂) e mantidas a 37°C. O nervo foi colocado sobre eletrodos de platina ligados a um estimulador Grass S48. O diafragma foi mantido por sua porção tendinosa sob tensão constante (5,0 g), através de fio ligado a transdutor isométrico Load Cell BG50 GMS, e submetido à estimulação indireta de 0,1 Hz de frequência e duração de 0,2 mseg, sendo que as variações de tensão produzidas pelas contrações do diafragma foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400. Para avaliar o efeito dos fármacos empregados isoladamente e associados na transmissão neuromuscular, formaram-se 3 grupos (n = 5): Grupo I – ropivacaína (5 µg.mL⁻¹); Grupo II - pancurônio (2 µg.mL⁻¹); Grupo III - pancurônio (2 µg.mL⁻¹) em preparação previamente exposta à ropivacaína (5 µg.mL⁻¹). No Grupo III (ropivacaína-pancurônio), o pancurônio foi adicionado à preparação 30 minutos após a adição da ropivacaína. As respostas musculares à estimulação indireta foram registradas durante 60 minutos após a adição dos fármacos.

A mesma preparação foi utilizada para estudar a efetividade dos fármacos (neostigmine - 2µg.mL⁻¹ e 4-aminopiridina - 20 µg.mL⁻¹) na reversão do bloqueio neuromuscular, que foram adicionadas à preparação após o bloqueio produzido pela associação ropivacaína-pancurônio. Também foram estudados em diafragma de ratos os efeitos da ropivacaína nos potenciais de placa terminal em miniatura e nos potenciais de membrana. Os parâmetros avaliados foram: 1) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 60 minutos após a adição de ropivacaína; 2) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 60 minutos após a adição do pancurônio isoladamente e em preparação previamente exposta a ropivacaína; 3) os potenciais de membrana (PM) e potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM); 4) a efetividade da neostigmina e da 4-aminopiridina na reversão do bloqueio neuromuscular.

Os resultados foram expressos em médias e desvios-padrão. O teste de Wilcoxon foi empregado para análise do potencial de membrana das fibras musculares e efetividade dos fármacos reversores do bloqueio. Para avaliar a redução da amplitude das respostas musculares foi utilizado o t de Student (distribuição normal). Assumiu-se nível significativo de 5% ($p < 0,05$). O poder do teste foi calculado e obteve-se $\beta > 20\%$ (poder $> 80\%$).

RESULTADOS

A ropivacaína na concentração estudada e empregada isoladamente não causou redução na amplitude das respostas musculares à estimulação elétrica indireta, em preparação nervo frênico-diafragma de rato. Com o pancurônio isoladamente e nas preparações previamente expostas à ropivacaína, as médias de amplitude das respostas musculares foram 45,1% e 6,2%, respectivamente, e o bloqueio correspondente foi de $54,9 \pm 14,1\%$ e $93,8 \pm 9,2\%$, respectivamente, com diferença significativa ($p=0,015$) - Figuras 1 e 2.

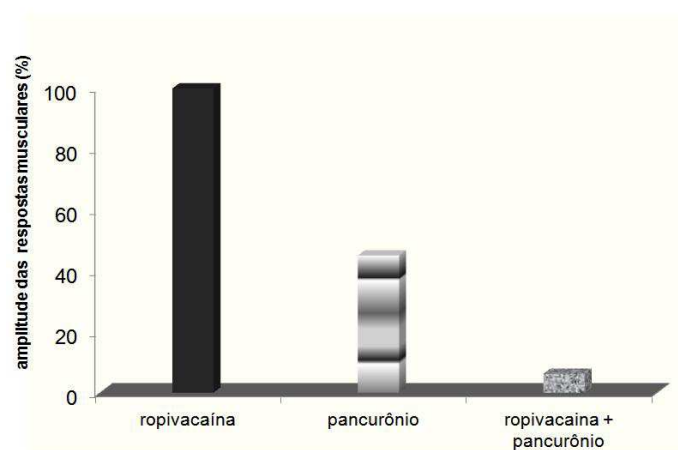


Figura 1 Amplitude das respostas musculares à estimulação indireta em preparação nervo frênico – diafragma de rato exposta à ropivacaína ($5,0\mu\text{g.mL}^{-1}$), pancurônio ($2\mu\text{g.mL}^{-1}$) e ropivacaína + pancurônio

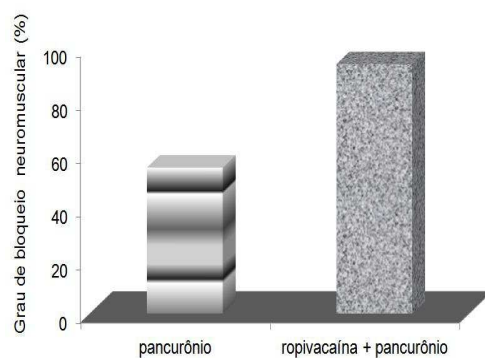


Figura 2 Grau de bloqueio com pancurônio isoladamente e em preparação previamente exposta à ropivacaína

O bloqueio neuromuscular causado pelo pancurônio, nas preparações expostas à ropivacaína, foi revertido parcial e totalmente pela neostigmina e pela 4-aminopiridina, respectivamente.

Não se observou efeito significativo da ropivacaína sobre os potenciais de membrana (Figura 3).

Os efeitos sobre os potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) caracterizaram-se por diminuição na frequência e amplitude até bloqueio total (Figura 4).

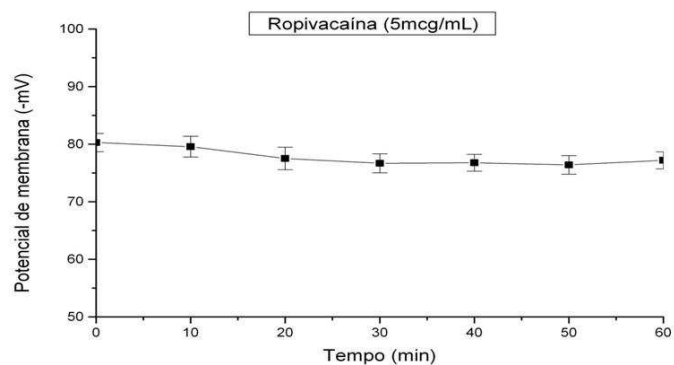


Figura 3 Efeito da ropivacaína ($5,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) no potencial de membrana em preparação diafragma de rato

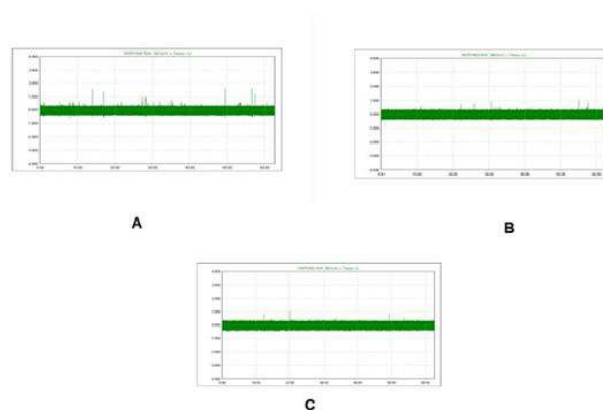


Figura 4 Efeito da ropivacaína ($5,0\mu\text{g.mL}^{-1}$) nos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM) em preparação de diafragma de rato. A: controle; B: 30 minutos após a adição de ropivacaína; C: 60 minutos após a adição de ropivacaína

DISCUSSÃO

Os efeitos dos anestésicos locais na junção neuromuscular e sua influência no bloqueio produzido por bloqueadores neuromusculares não-despolarizantes é ainda alvo de pouca investigação, no entanto esta interação tem sido descrita em trabalhos experimentais e em humanos^{1-7,12}. Estudos experimentais^{5-7,13} vem dando embasamento para os resultados observados na clinica, com a vantagem da possibilidade de eliminar um viés, que é a grande variabilidade individual de resposta aos bloqueadores neuromusculares^{10,14}.

Embora somente em altas doses os anestésicos locais possam produzir bloqueio neuromuscular, a interação com os bloqueadores neuromusculares, particularmente os não-despolarizantes, torna-se clinicamente relevante, necessitando-se de observação cuidadosa quando do emprego simultâneo desses agentes, ou em situações em que a margem de segurança da transmissão neuromuscular estiver reduzida^{1-4,12,14,15}.

São admitidos vários mecanismos para explicar a interação entre os anestésicos locais e os bloqueadores neuromusculares. Na região pré-sináptica, deprimem seletivamente a condução nas fibras motoras e inibem a liberação da acetilcolina durante a estimulação nervosa. Ao nível pós-sináptico os anestésicos locais podem se ligar a diferentes sítios específicos de acetilcolina, resultando em dessensibilização de receptores, além de poder ocasionar oclusão temporária de canais dos receptores nicotínicos. Adicionalmente, são descritos uma ação estabilizadora da membrana pós-juncional, e interferência com o mecanismo de excitação-contracção da fibra muscular^{5-7, 11,13,16-19}.

A concentração de ropivacaína empregada foi estabelecida em projeto piloto e determinada a partir de dados apresentados em estudos realizados em nosso meio onde foram utilizados outros anestésicos locais amino-amidas com características semelhantes a ropivacaína^{6,7}. Matsuo e col.¹³ em preparação semelhante à utilizada neste estudo avaliaram a associação de d-tubocurarina a diferentes anestésicos locais, e observaram que mesmo em concentrações ineficazes, os anestésicos locais potencializaram o bloqueador neuromuscular, evidenciado pela diminuição significativa da ED50. Em relação à influência dos bloqueadores neuromusculares nos efeitos dos anestésicos locais, estes autores também descreveram que concentrações ineficazes de d-tubocurarina causaram similar diminuição da ED50 e aumento na potência dos anestésicos locais. Em ensaio clínico Sahin e col.⁴ avaliaram as características do bloqueio neuromuscular produzido pelo vecurônio em pacientes submetidos à anestesia geral associada ao bloqueio epidural com levobupivacaína a 0,5% (15 mL) e observaram aumento significativo no índice de recuperação e duração total do efeito do vecurônio, sem no entanto influenciar na sua duração clínica (DC25%). Estes achados podem ser justificados pelo fato do metabolismo da levobupivacaína, quando empregada no espaço epidural, só ocorrer em aproximadamente 30 minutos, quando o fármaco atinge a circulação¹.

O presente estudo mostrou que, na concentração estudada, a ropivacaína empregada isoladamente não exerceu efeitos na junção neuromuscular, no entanto potencializou o bloqueio produzido pelo pancurônio. Estes resultados assemelham-se aos de outros autores que não observaram em trabalhos experimentais e clínicos, prejuízo na transmissão neuromuscular,

quando do emprego isolado de diferentes anestésicos locais. No entanto foi descrita evidente potencialização no efeito de vários bloqueadores neuromusculares como resultado da associação desses fármacos, interação que pode ser consequente à potencialização verdadeira, causada pela ação dos dois tipos de drogas, em diferentes locais da junção neuromuscular^{1,2,4-7,12,13,20}.

Acredita-se que o maior bloqueio neuromuscular ocasionado pelo pancurônio, nas preparações de diafragma de ratos previamente expostas a ropivacaína, e evidenciado por uma maior redução na amplitude das respostas musculares a estimulação do nervo frênico, seja devido a uma ação pré-sináptica da ropivacaína, e não a ação despolarizante na fibra muscular, visto que nos estudos eletrofisiológicos, observou-se que a ropivacaína na concentração empregada não alterou o potencial de membrana das fibras musculares. A ação pré-sináptica foi demonstrada pela diminuição na frequência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM), ocasionado pela ropivacaína, resultado de alteração na liberação quantal de acetilcolina.

O bloqueio neuromuscular ocasionado pela associação ropivacaína-pancurônio foi totalmente revertido com a 4-aminopiridina e em menor proporção com a neostigmine. Esses resultados também foram descritos por Sahin et al⁴, que observaram em humanos maior eficácia da 4-aminopiridina em relação a neostigmine, na reversão de bloqueio ocasionado pelo vecurônio, em pacientes que receberam levobupivacaína no espaço peridural. Em trabalhos experimentais, resultados semelhantes foram encontrados na reversão do bloqueio resultante da associação lidocaína-rocurônio⁵.

A neostigmine, ao inibir a acetilcolinesterase, aumenta a concentração do neurotransmissor na fenda sináptica sendo capaz de deslocar competitivamente os agentes causadores do bloqueio. O antagonismo parcial pela neostigmine reforça esse achado, uma vez que os anticolinesterásicos são eficazes apenas na reversão do bloqueio pós-sináptico. A 4-aminopiridina, além do efeito inibidor de dessensibilização de receptores nicotínicos da placa terminal, provoca aumento quantal de acetilcolina. Esse aumento é resultante de ações na membrana das terminações nervosas, como a inibição dos canais de potássio, que produz aumento na duração do potencial de ação, e o maior influxo de íons cálcio para as terminações nervosas motoras durante a despolarização da membrana²¹⁻²³. O antagonismo completo obtido com a 4-aminopiridina sugeriu que a interação da

ropivacaína com o pancurônio tem componente pré-sináptico, relacionado à diminuição da liberação de acetilcolina.

A ropivacaína isoladamente não comprometeu a transmissão neuromuscular, mas potencializou o bloqueio produzido pelo pancurônio, que foi revertido pela neostigmina e 4-aminopiridina. Esses resultados são importantes para a prática clínica, no sentido de orientar quanto a necessidade do emprego de monitorização dos efeitos dos bloqueadores neuromusculares, particularmente quando do uso associado a outros fármacos.

REFERÊNCIAS

1. Toft P, Kirkegaard Nielsen H, Severinsen I et al. - Effect of epidurally administered bupivacaine on atracurium-induced neuromuscular blockade. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1990;34:649-652.
2. 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.
3. Suzuki T, Mizutani H, Ishikawa K et al. - Epidurally administered mepivacaine delays recovery of train-of-four ratio from vecuronium-induced neuromuscular block. *Br J Anaesth*, 2007;99:721-725.
4. Sahin SH, Colak A, Sezer A et al. - Effect of epidural levobupivacaine on recovery from vecuronium-induced neuromuscular block in patients undergoing lower abdominal surgery. *Anaesth Intensive Care*, 2011;39:607-610.
5. Loyola YC, Braga Ade F, Potério GM et al. - Influence of lidocaine on the neuromuscular block produced by rocuronium: study in rat phrenic-diaphragmatic nerve preparation. *Rev Bras Anesthesiol*, 2006;56:147-156.
6. Braga Ade F, Carvalho VH, Braga FS et al. - Influence of local anesthetics on the neuromuscular blockade produced by rocuronium: effects of lidocaine and 50% enantiomeric excess bupivacaine on the neuromuscular junction. *Rev Bras Anesthesiol*, 2009;59:725-734.
7. Carvalho VH, Braga Ade F, Braga FS et al. - The influence of lidocaine and racemic bupivacaine on neuromuscular blockade produced by rocuronium. A study in rat phrenic nerve-diaphragm preparation. *Acta Cir Bras*, 2009;24:211-215.
8. Covino BG - Pharmacology of local anaesthetic agents. *Br J Anaesth*, 1986;58:701-716.

9. McLure HA, Rubin AP - Review of local anaesthetic agents. *Minerva Anesthesiol*, 2005;71:59-74.
10. 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.
11. Bulbring E - Observation on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol*, 1946; 1:38-61.
12. Cardoso LSM, Martins CR, Tardelli MA - Efeitos da lidocaína por via venosa sobre a farmacodinâmica do rocurônio. *Rev Bras Anesthesiol*, 2005;55:371-380.
13. Matsuo S, Rao DB, Chaudry I et al. - Interaction of muscle relaxants and local anesthetics at the neuromuscular junction. *Anesth Analg*, 1978;57:580-587.
14. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK et al. - Anesthetic agents, adjuvants, and drug interaction. In: Barash PG. *Clinical Anesthesia*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Kluwer Business 2009, p. 514-515.
15. Carpenter RL, Mulroy MF - Edrophonium antagonize combined lidocaine-pacuronium and verapamil-pancuronium neuromuscular blockade in cats. *Anesthesiology*, 1986;65:506-510.
16. Neher E, Steinbach JH - Local anesthetics transiently block currents through single acetylcholine-receptor channels. *J Physiol*, 1978; 277:153-176.
17. Pederneiras SG - Interação de drogas com relaxantes musculares. *Rev Bras Anesthesiol*, 1988; 38:63-73.
18. Suzuki T, Nagai H, Katsumata N et al. - Investigation of fading responses induced by non-depolarising muscle relaxants in the evoked EMG of the gastrocnemius muscle of the cat. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1999;43:658-662.
19. Usubiaga JE, Wikinski JA, Morales RL et al. - Interaction of intravenously administered procaine, lidocaine and succinylcholine in anesthetized subjects. *Anesth Analg*, 1967;46:39-45.
20. Ellis CH, Wnuck AL, De Beer EJ et al. - Modifying actions of procaine on the myoneural blocking actions of succinylcholine, decamethonium and d-tubocurarine in dogs and cats. *Am J Physiol*, 1953; 174:277-282.

- 21.Ulbricht W, Wagner HH - Block of potassium channels of the nodal membrane by 4-aminopyridine and its partial removal on depolarization. *Pflugers Arch*, 1976;367:77-87.
- 22.Harvey AL, Marshall IG - The facilitatory actions of aminopyridines and tetraethylammonium on neuromuscular transmission and muscle contractility in avian muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1977;299:53-60.
- 23.Harvey AL, Marshall IG - The actions of three diaminopyridines on the chick biventer cervicis muscle. *Eur J Pharmacol*, 1977;44:303-309.

8.5 ANEXO 5 – TABELAS

Tabela 6. Valores individuais, médias e desvios-padrão da redução (%) na amplitude das respostas musculares a estimulação elétrica indireta em preparação nervo frênico-hemidiafragma de rato, causada pelo pancurônio isoladamente (2 µg/mL) e pelo pancurônio (2 µg/mL) em preparação previamente exposta à ropivacaína (5 µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio	pancurônio e ropivacaína	p
1	62,50	89,65	
2	67,75	79,31	
3	56,25	100	
4	31,12	100	
5	57,15	100	
X ± DP	54,9 ± 14,1	93,8 ± 9,2	0,0153

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-hemidiafragma de rato, causada pelo pancurônio isoladamente (2 µg/mL) e pelo pancurônio (2 µg/mL) em preparação previamente exposta à levobupivacaína (5µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio	pancurônio e levobupivacaína	p
1	62,50	93,33	
2	67,75	100	
3	56,25	57,58	
4	31,12	100	
5	57,15	100	
X ± DP	54,9 ± 14,1	90,2 ± 18,4	0,0317

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-hemidiafragma de rato, causada pelo pancurônio isoladamente (2 µg/mL) e pelo pancurônio (2 µg/mL) em preparação previamente exposta à mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio	pancurônio e bupivacaína (S75-R25)	p
1	62,50	100	
2	67,75	100	
3	56,25	100	
4	31,12	100	
5	57,15	100	
X ± DP	54,9 ± 14,1	100 ± 0	0,002
teste t de Student			

Tabela 9. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio isoladamente (2 µg/mL) e após reversão do bloqueio com neostigmina (2 µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio	neostigmina	p
1	37,5	100	
2	32,25	100	
3	43,75	100	
4	68,88	93,33	
5	42,85	71,42	
X ± DP	45,05 ± 14,1	92,95 ± 12,4	0,0059
teste t de Student pareado			

Tabela 10. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio isoladamente (2 µg/mL) e após reversão do bloqueio com 4-aminopiridina (20 µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio	4- aminopiridina	p
1	38,0	100	
2	33,0	100	
3	43,5	100	
4	67,0	100	
5	43,0	100	
X ± DP	44,9 ± 13,07	100 ± 0	0,0010

teste t de Student pareado

Tabela 11. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e ropivacaína (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com neostigmina (2 µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio e ropivacaína	neostigmina	p
1	11,0	100	
2	24,0	100	
3	10,0	67,0	
4	12,0	45,0	
5	25,0	98,0	
X ± DP	16,4 ± 7,4	82,0 ± 25,0	0,0011

teste t de Student pareado

Tabela 12. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e levobupivacaína (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com neostigmina (2 µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio e levobupivacaína	neostigmina	p
1	10,0	82,0	
2	9,5	70,0	
3	24,0	90,0	
4	9,8	71,0	
5	12,00	65,0	
X ± DP	13,1 ± 6,2	75,6 ± 10,2	0,0003

teste t de Student pareado

Tabela 13. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com neostigmina (2 µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio e bupivacaína (S75-R25)	neostigmina	p
1	0	86,66	
2	0	86,66	
3	0	90,32	
4	0	73,33	
5	0	79,31	
X ± DP	0 ± 0	83,3 ± 6,8	0,0001

teste t de Student pareado

Tabela 14. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e ropivacaína (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com 4- aminopiridina (20 µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio e ropivacaína	4-aminopiridina	p
1	10,35	100	
2	20,69	100	
3	10,5	100	
4	12,0	100	
5	22,5	100	
X ± DP	15,2 ± 5,9	100 ± 0	0,0001

teste t de Student pareado

Tabela 15. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e levobupivacaína (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com 4- aminopiridina (20 µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio e levobupivacaína	4-aminopiridina	p
1	8,8	100	
2	8,5	100	
3	13,0	100	
4	12,0	100	
5	10,0	100	
X ± DP	10,5 ± 2,0	100	0,0004

teste t de Student pareado

Tabela 16. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude (%) das respostas musculares em hemidiafragma de rato, após a administração de pancurônio (2 µg/mL) e mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) – (5 µg/mL) e após reversão do bloqueio com 4-aminopiridina (20 µg/mL)

Experimentos (n=5)	pancurônio e bupivacaína (S75-R25)	4-aminopiridina	p
1	0	100	
2	0	100	
3	0	100	
4	0	100	
5	0	100	
X ± DP	0 ± 0	100 ± 0	0,0001

teste t de Student pareado

Tabela 17. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude da resposta (%) causada pela Acetilcolina (5 µg/mL), antes e após a adição de ropivacaína (5 µg/mL), e percentual de redução, em preparação *biventer cervicis* de pintainho

Experimentos (n=4)	antes da ropivacaína	após a ropivacaína	% de redução	p
1	100	87,5	12,5	
2	100	85,7	14,3	
3	100	75,0	25,0	
4	100	87,5	12,5	
X ± DP	100	83,92 ± 6,01	16,07 ± 6,01	0,1250

teste t de Student para amostras pareadas

Tabela 18. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude da resposta (%) causada pela Acetilcolina (5 µg/mL), antes e após a adição de levobupivacaína (5 µg/mL) e percentual de redução, em preparação *biventer cervicis* de pintainho

Experimentos (n=4)	antes da levobupivacaína	após a levobupivacaína	% de redução	p
1	100	85,71	14,29	
2	100	77,0	23,1	
3	100	80,0	20,0	
4	100	80,0	20,0	
X ± DP	100	80,67 ± 3,63	19,35 ± 3,67	0,0018

teste t de Student para amostras pareadas

Tabela 19. Valores individuais, médias e desvios-padrão da amplitude da resposta (%) causada pela Acetilcolina (5 µg/mL), antes e após a adição de mistura com excesso enantiomérico de 50% de bupivacaína (S75-R25) - (5 µg/mL) e percentual de redução, em preparação *biventer cervicis* de pintainho

Experimentos (n=4)	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	
X ± DP	100	66,87 ± 11,51	33,12 ± 11,51	0,0104

teste t de Student para amostras pareadas

