

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

Influence of Nifedipine on the Neuromuscular Block Produced by Atracurium and Cistracurium. Study in Rat Phrenic-Diaphragmatic Nerve Preparation

Silmara Rodrigues de Sousa¹, Angélica de Fátima de Assunção Braga, TSA², Glória Maria Braga Potério, TSA², Franklin Sarmiento da Silva Braga³, Yolanda Christina S Loyola¹, Samanta Cristina Antoniassi Fernandes¹.

RESUMO

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

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

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

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

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

Unitermos: ANIMAIS: ratos; BLOQUEADORES DE CANAIS DE CÁLCIO: nifedipina; BLOQUEADORES NEUROMUSCULARES, Não-despolarizantes: atracúrio, cisatracúrio.

SUMMARY

Sousa SR, Braga AFA, Poterio GMB, Braga FSS, Loyola YCS, Fernandes SCA – Influence of Nifedipine on the Neuromuscular Block Produced by Atracurium and Cistracurium. Study in Rat Phrenic-Diaphragmatic Nerve Preparation.

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Calcium channel blockers may interact with neuromuscular blockers, increasing its effects. Research studies about this interaction display controversial results. In some studies these drugs produced neuromuscular blockage, or contracture, or no effect at all was proved over skeletal neuromuscular response. This study assessed the nifedipine effects over muscular responses and its possible interaction with neuromuscular blockers in rat diaphragm.

METHODS: A number of 25 rats were used, weighing between 250 and 300 g and sacrificed under anesthesia with intraperitoneal pentobarbital (40 mg.kg⁻¹). Preparation was mounted according to the technique described by Bulbring. Diaphragm was kept under tension, connected to an isometric transducer and subjected to an indirect stimulation of 0.1 Hz frequency. Diaphragm contractions were registered on a physiograph. In order to evaluate the effect of these drugs on neuromuscular transmission, they were added separately or associated to the preparation, on the following concentrations: nifedipine (4 µg.mL⁻¹); atracurium (20 µg.mL⁻¹); cistracurium (3 µg.mL⁻¹). On phrenic-nerve preparation, the assessed items were: 1) the extent of diaphragm muscle response to indirect stimulation, before and 45 minutes after adding nifedipine and neuromuscular blockers separately and after the association of both drugs; 2) nifedipine effects on membrane potentials (MP) and miniature end-plate potentials (MEPP).

RESULTS: Employed separately, nifedipine did not alter the extent of muscular responses, but it did significantly increase the neuromuscular blocking activity of atracurium and cistracurium. Nifedipine did not alter the membrane potential and caused an initial increase on MEPP frequencies, followed by a blockage.

CONCLUSIONS: Nifedipine, on the employed concentration, increased the neuromuscular blockage produced by atracurium and cistracurium. Electrophysiological studies demonstrate the existence of presynaptic action and absence of depolarizing action over the muscle fiber.

Key Words: ANIMALS: rats; CALCIUM CHANNEL BLOCKERS: nifedipine; NEUROMUSCULAR BLOCKERS, Nondepolarizing: atracurium, cistracurium.

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

1. Aluna do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia da FCM da UNICAMP.

2. Professora Associada do Departamento de Anestesiologia da FCM da UNICAMP

3. Professor Doutor do Departamento de Anestesiologia da FCM da UNICAMP

Apresentado (Submitted) em 26 de setembro de 2005

Aceito (Accepted) para publicação em 09 de dezembro de 2005

Endereço para correspondência (Correspondence to):

Dra. Angélica de Fátima de Assunção Braga

Rua Luciano Venere Decourt, 245

Cidade Universitária

13084-040 Campinas, SP

E-mail: franklinbraga@terra.com.br

© Sociedade Brasileira de Anestesiologia, 2006

INTRODUÇÃO

Os bloqueadores de canais de cálcio são amplamente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares como angina pectoris, cardiomiopatias, hipertensão arterial e disritmias supraventriculares. Embora inúmeros estudos tenham sido realizados para investigar os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio nas respostas musculares e sua interação com bloqueadores neuromusculares (BNM), os resultados ainda são conflitantes. Alguns estudos mostraram que os bloqueadores de canais de cálcio produzem bloqueio neuromuscular¹⁻⁵, outros relataram contratura muscular^{6,7} ou mesmo nenhum efeito na musculatura esquelética foi evidenciado⁸⁻¹⁰. É pouco provável que em doses terapêuticas os bloqueadores de Ca^{++} possam determinar bloqueio neuromuscular, mas quando a margem de segurança da transmissão neuromuscular está comprometida pelo uso de BNM ou por doenças neuromusculares, pode haver exacerbação da paralisia muscular¹¹. Portanto trabalhos apontam para a interação entre bloqueadores de canais de cálcio e bloqueadores neuromusculares, com potencialização dos efeitos dos bloqueadores neuromusculares^{2,4,8-10,12-14}. A nifedipina é um bloqueador de canal de cálcio, derivado da dihidropiridina, disponível somente para uso por via oral, com potente atividade vasodilatadora periférica e coronariana, e mínimo efeito nos vasos de capacitância¹⁵.

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

MÉTODO

O estudo experimental e os procedimentos usados estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Foram utilizados 25 ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 250 e 300 g sacrificados sob anestesia com pentobarbital (40 mg.kg⁻¹), por via intraperitoneal, e após sangria por secção dos vasos do pescoço, a preparação foi feita de acordo com a técnica descrita por Bulbring¹⁶. Os hemidiafragmas com os nervos frênicos correspondentes foram retirados e fixados em cuba contendo 40 mL de solução nutritiva de Tyrode com a seguinte composição em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; NaHCO₃ 11,9; MgCl₂ 0,25; NaH₂PO₄ 0,3 e glicose 11. A solução foi aerada constantemente com carbogênio (95% O₂ + 5% CO₂) e mantida a 37 °C. O nervo foi colocado sobre eletrodos de platina ligados a um estimulador Grass S48. O diafragma foi mantido por sua porção tendinosa sob tensão constante (5 g) através de um fio ligado a um transdutor isométrico Load Cell BG50 GMS, e submetido à estimulação indireta de 0,1 Hz de frequência e duração de 0,2 msec e as variações de tensão pro-

duzidas pelas contrações do diafragma foram registradas em fisiógrafo Gould RS 3400. Formaram-se três grupos (n = 5) para avaliar os efeitos das drogas na transmissão neuromuscular, quando empregadas isoladamente: nifedipina (4 µg.mL⁻¹); atracúrio (20 µg.mL⁻¹); cisatracúrio (3 µg.mL⁻¹). Em outros dois grupos (n = 5) foram estudados os efeitos das associações nifedipina aos dois bloqueadores neuromusculares (atracúrio e cisatracúrio) sobre a amplitude das respostas musculares. As respostas musculares a estimulação indireta foram registradas durante 45 minutos após a adição das drogas. Utilizou-se também a preparação nervo frênico-diafragma de rato (NFD) para o estudo dos efeitos da nifedipina nos potenciais de placa terminal em miniatura e nos potenciais de membrana. Foram avaliados: 1) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 45 minutos após a adição de nifedipina e dos bloqueadores neuromusculares isoladamente; 2) a amplitude das respostas do músculo diafragma à estimulação indireta, antes e 45 minutos após a adição da associação nifedipina - bloqueador neuromuscular; 3) os efeitos da nifedipina sobre os potenciais de membrana (PM) e potenciais de placa terminal em miniatura (PPTM). Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão. Para análise estatística foram utilizados os testes *t* de Student e *t* de Student para amostras pareadas. Assumiu-se um nível de significância de 5% ($\alpha = 5\%$). O poder do teste foi calculado e obteve-se $\beta > 20\%$ (poder $> 80\%$).

RESULTADOS

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

Nas preparações tratadas com nifedipina o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio foi de 64,19% \pm 9,37%, sendo significativamente maior ($p = 0,0053$) do que quando o atracúrio foi empregado isoladamente (45,02% \pm 6,33%) (Figura 2). O bloqueio produzido pela associação nifedipina:cisatracúrio foi de 74,04% \pm 10,12%, significativamente maior ($p = 0,0038$) do que o observado com o cisatracúrio empregado isoladamente (48,01 \pm 10,33%) (Figura 3).

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

INFLUÊNCIA DA NIFEDIPINA NO BLOQUEIO NEUROMUSCULAR PRODUZIDO
PELO ATRACÚRIO E PELO CISATRACÚRIO. ESTUDO EM PREPARAÇÕES
NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE RATO

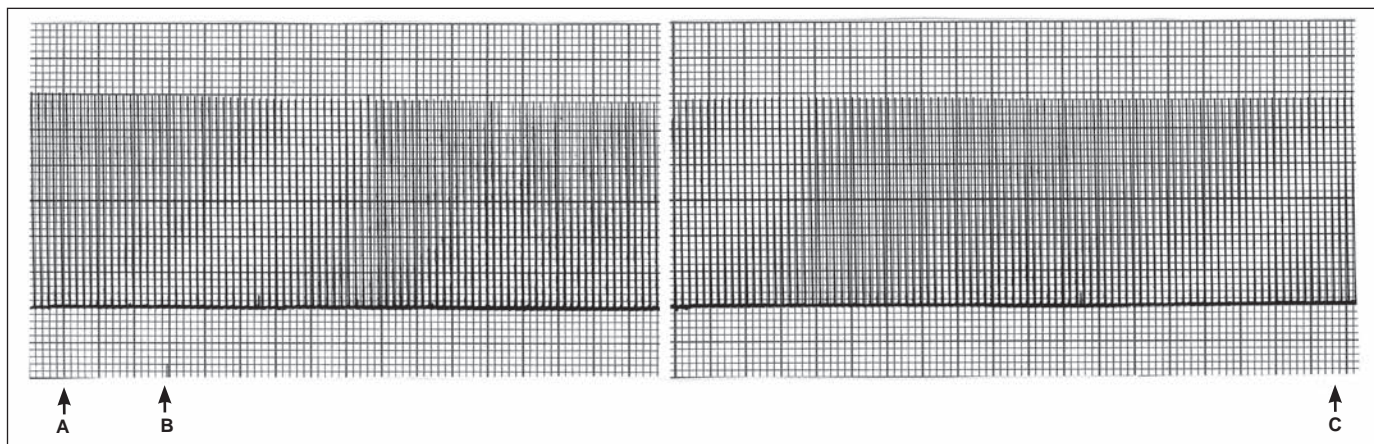


Figura 1 - Efeito da Nifedipina ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) nas Respostas Musculares à Estimulação Indireta em Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Rato. A: controle; B: adição de nifedipina; C: 45 minutos após a adição de nifedipina

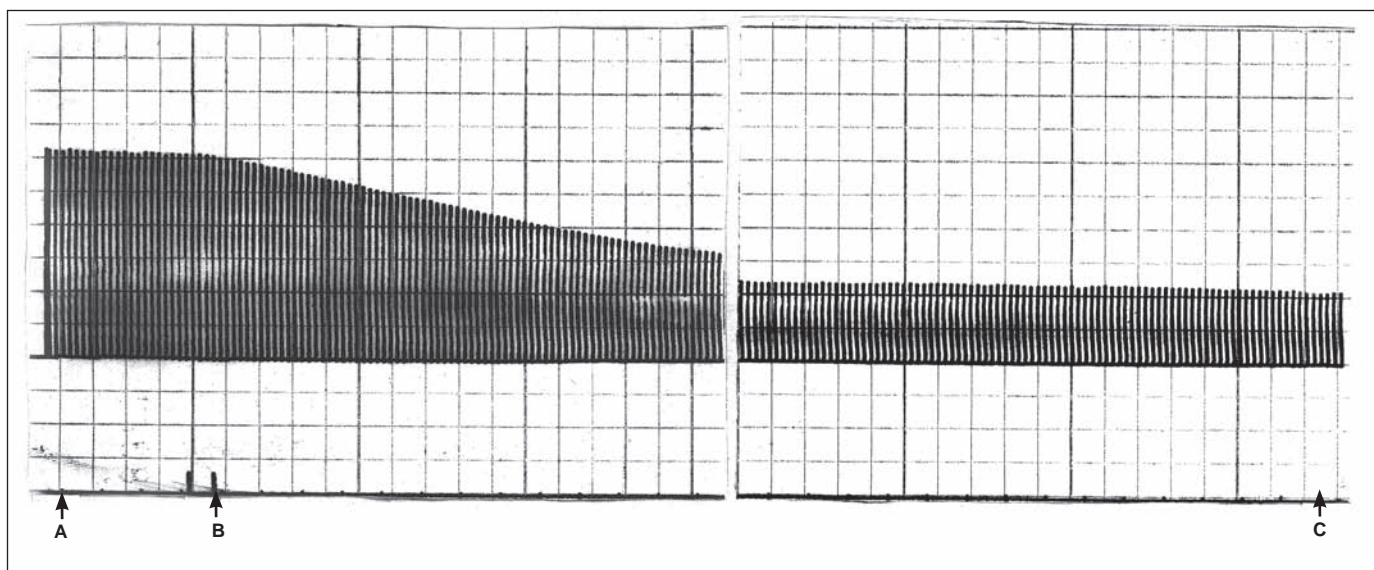
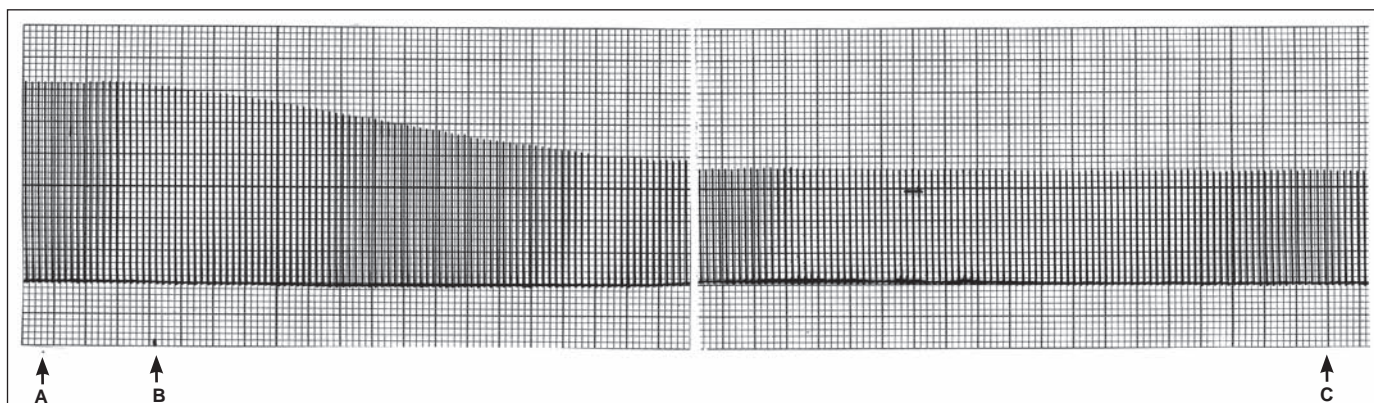


Figura 2 - Efeito do Atracúrio Isoladamente – $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (superior) e de sua Associação à Nifedipina – $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (inferior) nas Respostas Musculares à Estimulação Indireta em Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Rato.

A: controle; B: adição do atracúrio ou associação atracúrio e nifedipina; C: 45 minutos após a adição do atracúrio ou associação atracúrio e nifedipina.

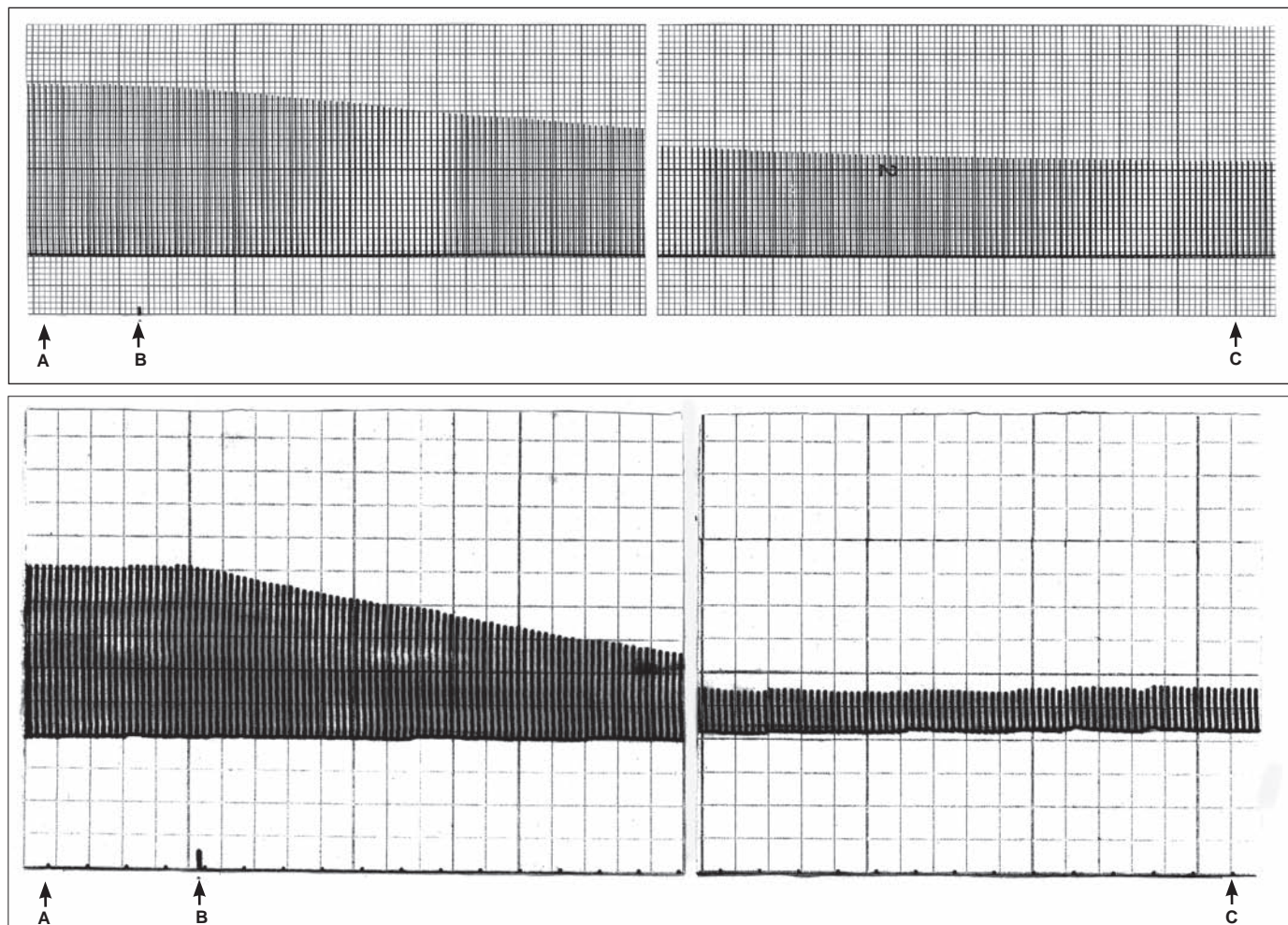


Figura 3 - Efeito do Cisatracúrio Isoladamente – $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (superior) e de sua Associação à Nifedipina $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (inferior) nas Respostas Musculares à Estimulação Indireta em Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Rato. A: controle; B: adição do cisatracúrio ou associação cisatracúrio e nifedipina; C: 45 minutos após a adição do cisatracúrio ou associação cisatracúrio e nifedipina.

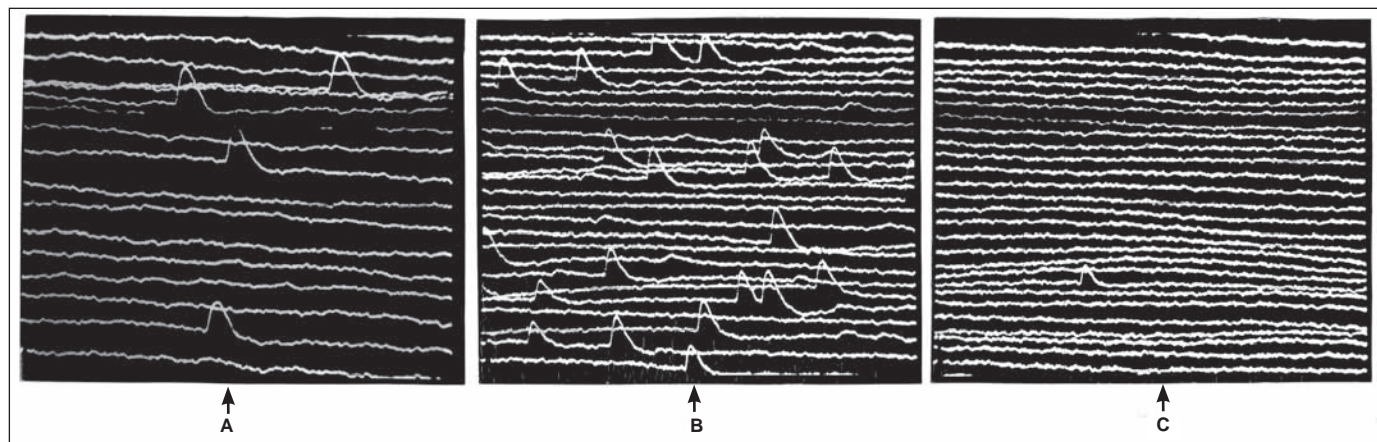


Figura 4 - Efeito da Nifedipina ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) nos Potenciais de Placa Terminal em Miniatura (PPTM) em Preparação Nervo Frênico-Diafragma de Rato. A: controle; B: 30 minutos após a adição de nifedipina, C: 60 minutos após a adição de nifedipina.

INFLUÊNCIA DA NIFEDIPINA NO BLOQUEIO NEUROMUSCULAR PRODUZIDO
PELO ATRACÚRIO E PELO CISATRACÚRIO. ESTUDO EM PREPARAÇÕES
NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE RATO

DISCUSSÃO

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

Estes efeitos foram demonstrados experimentalmente, em preparações isoladas, em animal intacto, e também foram confirmados na clínica, em paciente portador de distrofia muscular de Duchenne que desenvolveu quadro de insuficiência respiratória aguda após a administração de verapamil para tratamento de flutter atrial ^{2-4,8-14,17,18,21}, assim como pela maior dificuldade na reversão do bloqueio neuromuscular em paciente tratado cronicamente com verapamil, sendo essas intercorrências atribuídas à propriedade bloqueadora neuromuscular do verapamil ²². O emprego da preparação isolada nervo – músculo (*in vitro*), adequadamente aerada e em temperatura mantida constante, possibilita a avaliação dos efeitos da nifedipina e bloqueadores neuromusculares, nas respostas musculares à estimulação indireta, excluindo-se outros fatores que possam interferir na transmissão neuromuscular. Além disso experimentos realizados em ratos são considerados mais adequados para investigar eventos pós-sinápticos, quando comparados aos desenvolvidos em cães ⁹.

Embora os efeitos dos bloqueadores de canais de cálcio tenham sido extensivamente investigados nos músculos cardíaco, liso vascular, respiratório e intestinal, existem poucos estudos sobre a ação dessas drogas na atividade neuromuscular. O músculo esquelético contém canais de cálcio tipo lento, similar ao observado nos músculos cardíaco e liso vascular, com locais especiais de ligação para os bloqueadores de canais de cálcio. Estes canais, nos músculos liso vascular e cardíaco, encontram-se situados sobre toda a membrana muscular e são muito sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio, enquanto que no músculo esquelético são menos sensíveis e situam-se no sistema tubular transversal ²³. Devido a essas particularidades alguns processos fisiológicos na junção neuromuscular ou no músculo podem ser alterados por estas drogas.

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

A semelhança de estudos anteriores, a nifedipina potencia-

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

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

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

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

Os anestesiólogos podem em algum momento se deparar com essa interação, quando da realização de anestesia em pacientes em uso crônico de bloqueadores de canais de cálcio ou mesmo diante da necessidade do uso dessas drogas para tratamento de intercorrências cardiocirculatórias durante o ato anestésico-cirúrgico. Resultados de estudos *in vitro* com a associação de bloqueadores de canais de cálcio e bloqueadores neuromusculares, sugerem que a interação entre esses dois grupos de drogas podem diferir de acordo com a forma de uso do bloqueador de canal de cálcio. Nos pacientes em uso crônico de antagonistas de canais de cálcio, essas drogas podem se acumular nos músculos e grande parte do bloqueio

pode ser atribuído ao antagonista de cálcio. Sua administração durante a anestesia pode aumentar temporariamente o grau de bloqueio neuromuscular, sem, no entanto, prolongar sua duração⁹. Os resultados mostram que a nifedipina na concentração empregada potencializou o bloqueio neuromuscular produzido pelo atracúrio e cisatracúrio. As alterações do potencial de placa terminal em miniatura exteriorizam uma ação pré-sináptica e a ausência de efeito no potencial de membrana demonstra não possuir ação despolarizante sobre a fibra muscular.

Influence of Nifedipine on the Neuromuscular Block Produced by Atracurium and Cistracurium. Study in Rat Phrenic-Diaphragmatic Nerve Preparation

Silmara Rodrigues de Sousa, M.D.; Angélica de Fátima de Assunção Braga, TSA, M. D.; Glória Maria Braga Potério, TSA, M. D.; Franklin Sarmiento da Silva Braga, M. D.; Yolanda Christina S Loyola, M.D.; Samanta Cristina Antoniassi Fernandes M.D.

INTRODUCTION

Calcium channel blockers are widely used to treat cardiovascular diseases such as angina pectoris, cardiomyopathy, arterial hypertension, and supraventricular dysrhythmia. Although several studies have been performed in order to investigate the effects of calcium channel blockers on muscular responses and their interaction with neuromuscular blockers (NMB), the results are still conflicting. Some studies showed that calcium channel blockers produce neuromuscular blockage¹⁻⁵, while others reported muscular contracture^{6,7} or even no effect on skeletal musculature was found⁸⁻¹⁰. It is less probable that, when administered on therapeutic doses, the Ca⁺⁺ blockers may determine neuromuscular blockage. But when the safety margin of neuromuscular transmission is compromised by NMB use or by neuromuscular diseases, there may be an exacerbation of muscular paralysis¹¹. Therefore, research works point to the interaction between calcium channel blockers and neuromuscular blockers with the increase of neuromuscular effects^{2,4,8-10,12-14}. Nifedipine is a calcium channel blocker which derives from dihydropyridine and it is available for oral use only. It also has a powerful vasodilative and coronary peripheral activity with a minimal effect on the capacitance vessels¹⁵.

This study aimed at assessing the nifedipine effect on neuromuscular transmission and its influence on neuromuscular blockage produced by atracurium and cistracurium.

METHODS

Both, experimental study and used procedures comply with the ethical principles about tests on animals adopted by the COBEA (Brazilian Association for Laboratory Animal Science) and were also approved by the Ethical Commission of Animal Experimentation from Biology Institute - UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas).

The study used 25 male rats from Wistar lineage, weighing between 250 and 300 g, sacrificed under anesthesia with intraperitoneal pentobarbital (40 mg.kg⁻¹), and bleeding by means of neck vessels section. Preparation was mounted according to the technique described by Bulbring¹⁶. The hemidiaphragms with corresponding phrenic nerves were removed and placed on a vat containing 40 mL of Tyrode nourishing solution, composed of the following elements in mM: NaCl 137; KCl 2.7; CaCl₂ 1.8; NaHCO₃ 11.9; MgCl₂ 0.25; NaH₂PO₄ 0.3, and glucose 11. This solution was constantly aerated with carbogen (95% O₂ + 5% CO₂) and kept at 37°C (99°F). The nerve was placed onto platinum electrodes connected to a S48 Grass stimulator. Diaphragm was maintained by its tendinous portion under constant tension (5.0 g), through a wire connected to a *Load Cell* BG50 GMS isometric transducer, and subjected to an indirect stimulation of 0.1 Hz frequency and lasting 0.2 msec. Tension variations produced by diaphragm contractions were registered on a Gould RS 3400 physiograph. Three groups were formed (n = 5) in order to evaluate the effects of the drugs on neuromuscular transmission when employed separately: nifedipine (4 µg.mL⁻¹); atracurium (20 µg.mL⁻¹); cistracurium (3 µg.mL⁻¹). Two other groups (n = 5) study the effects of associating nifedipine with both neuromuscular blockers (atracurium and cistracurium) over the extent of muscular responses. Muscular responses to indirect stimulation were registered during 45 minutes after adding the drugs. Rat phrenic-nerve preparation (FND) was also used to study the effects of nifedipine on miniature end-plate potentials and on membrane potentials. The following items were assessed: 1) the extent of diaphragm muscle response to indirect stimulation, both before and 45 minutes after adding the nifedipine and neuromuscular blockers separately; 2) the extent of diaphragm muscle response to indirect stimulation, both before and 45 minutes after adding the association between nifedipine and the neuromuscular blocker; 3) nifedipine effects over membrane potentials (MP) and miniature end-plate potentials (MEPP). The results were expressed on mean and standard deviations. For a statistical analysis, the Student *t* and Student *t* for paired samples tests were used. A significant level of 5% ($\alpha = 5\%$) was assumed. The power of test was calculated and a value of $\beta > 20\%$ was found (power > 80%).

RESULTS

Nifedipine, on the studied concentration and separately employed on FND specimens, did not cause extent reduction on the muscular responses to indirect electric stimulation (Figure 1).

On preparation treated with nifedipine, the neuromuscular blockage produced by atracurium was 64.19% ± 9.37%, being significantly higher ($p = 0.0053$) than when atracurium was separately employed (45.02% ± 6.33%) (Figure 2). Blockage produced by the association between nifedipine and cistracurium was 74.04% ± 10.12%, significantly higher ($p = 0.0038$) than the one observed when cistracurium was employed separately (48.01 ± 10.33%) (Figure 3).

It was not noted any significant effect of nifedipine over membrane potentials. The effects over miniature end-plate potentials initially feature a frequency increase, noted 30 minutes after adding the drug, followed by a blockage at 60 minutes (Figure 4).

INFLUENCE OF NIFEDIPINE ON THE NEUROMUSCULAR BLOCK PRODUCED BY ATRACURIUM AND CISTRACURIUM. STUDY IN RAT PHRENIC-DIAPHRAGMATIC NERVE PREPARATION

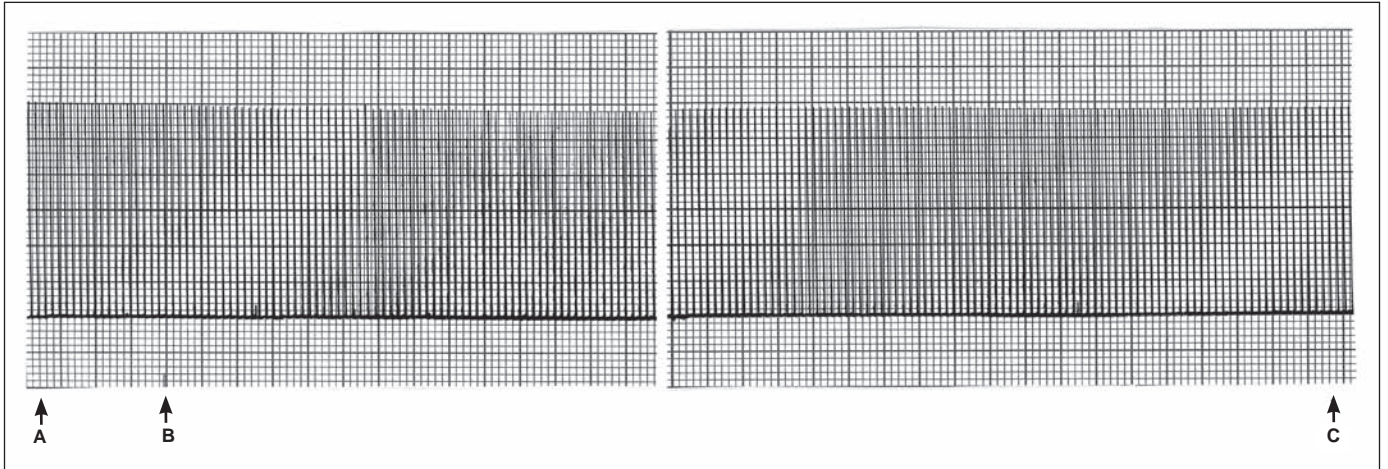


Figure 1 - Nifedipine ($4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Effect on Muscular Responses to Indirect Stimulation on Phrenic-Nerve Preparation Rat Diaphragm. A: control; B: Nifedipine addition; C: 45 minutes after nifedipine addition.

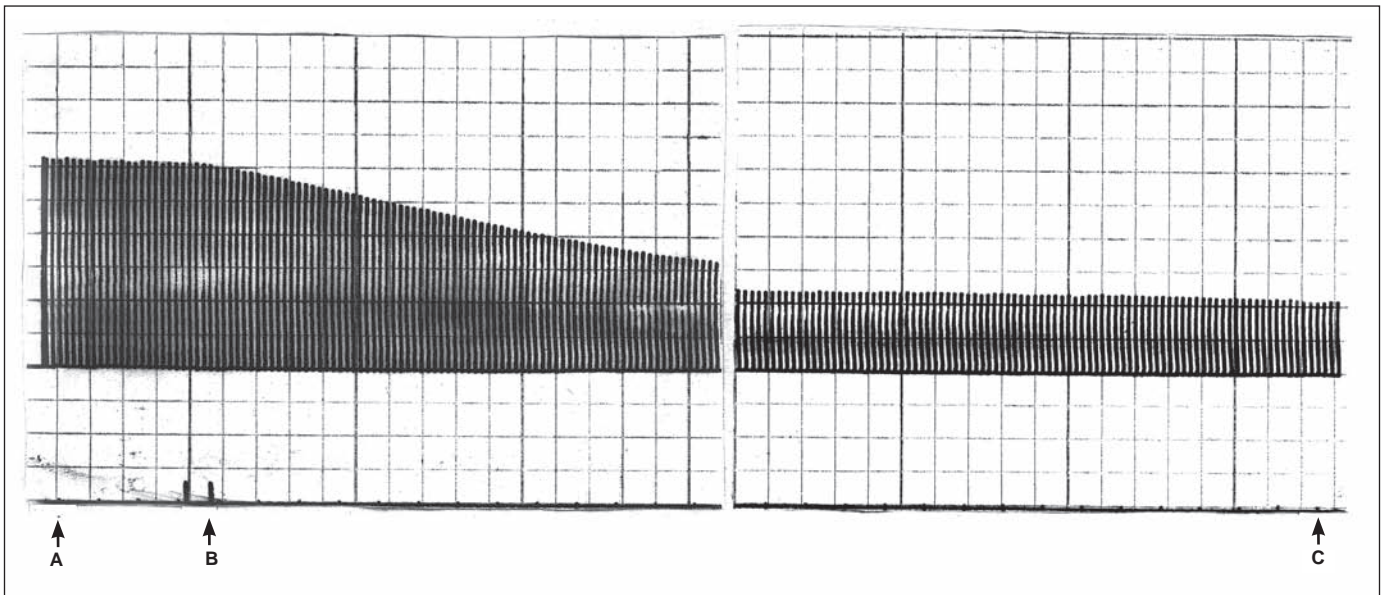
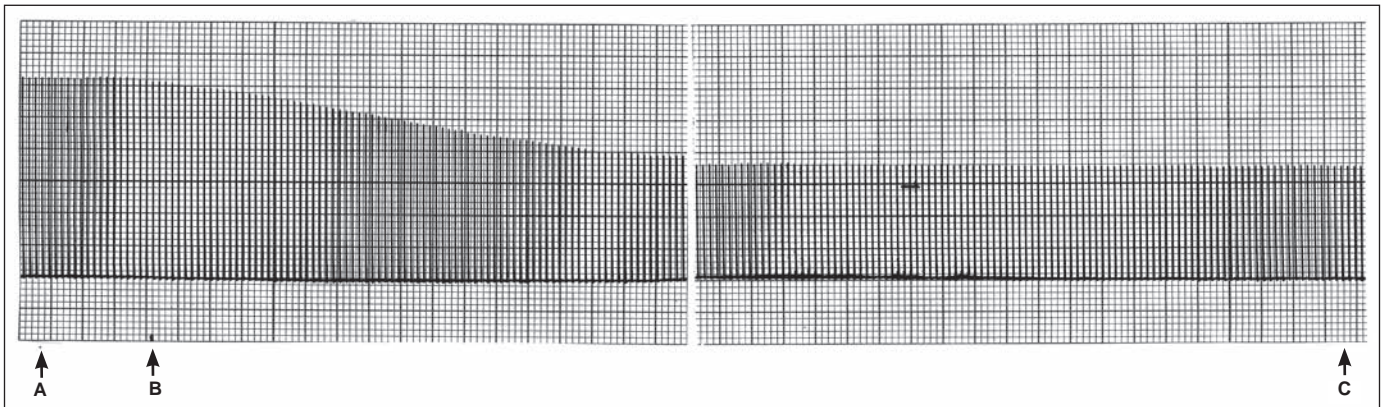


Figure 2 - Atracurium Effects Separately – $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (superior) and Associated to Nifedipine – $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (inferior) on Muscular Responses to Indirect Stimulation on Phrenic-Nerve Preparation Rat Diaphragm. A: control; B: Atracurium addition or association between atracurium and nifedipine; C: 45 minutes after atracurium addition or association atracurium and nifedipine.

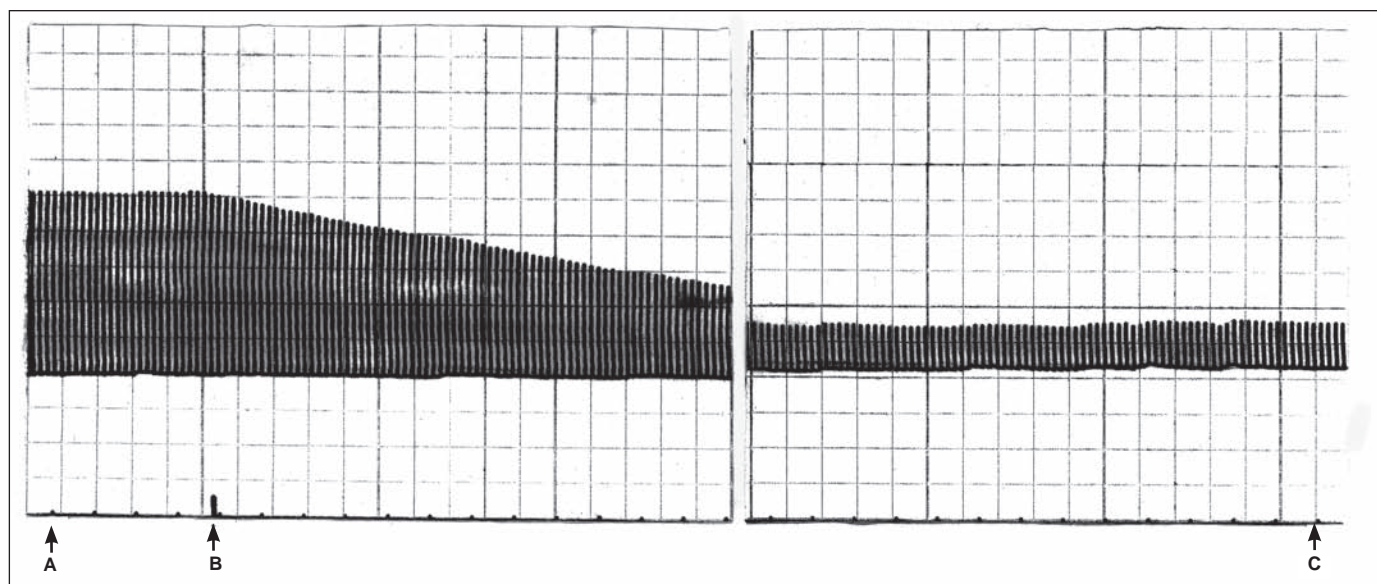
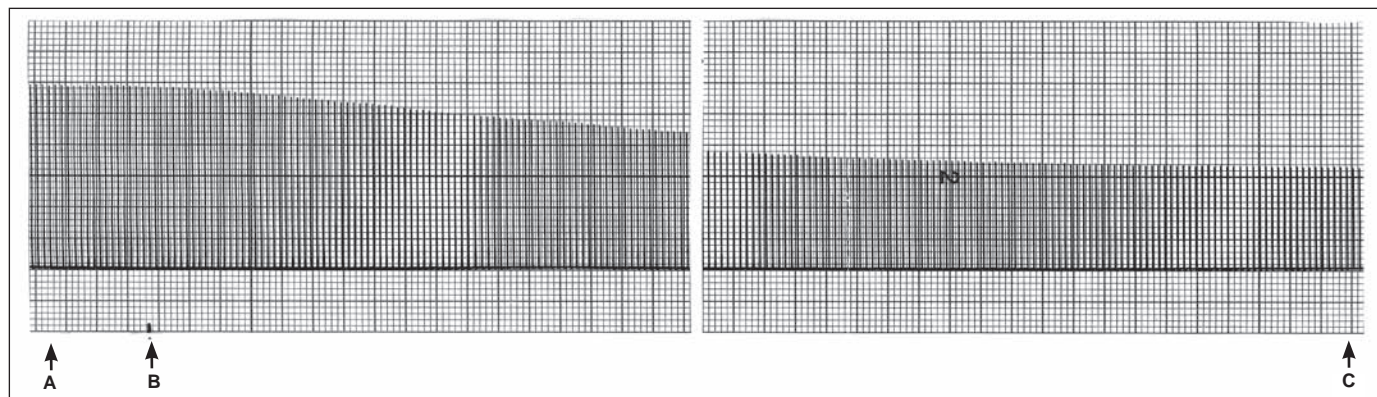


Figure 3 - Cistracurium Effects Separately – $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (superior) and Associated to Nifedipine $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (inferior) on Muscular Responses to Indirect Stimulation on Phrenic-Nerve Preparation Rat Diaphragm. A: control; B: Cistracurium addition or association cistracurium and nifedipine; C: 45 minutes after cistracurium addition or association cistracurium and nifedipine.

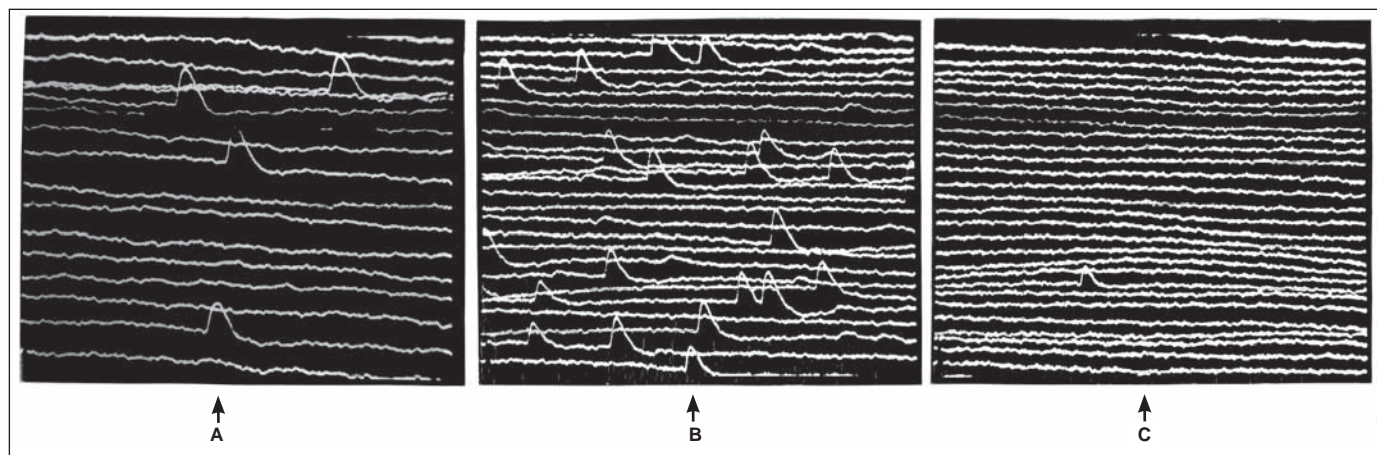


Figure 4 – Nifedipine Effect ($4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) on Miniature End-plate Potentials (MEPP) on Phrenic-Nerve Preparation Rat Diaphragm. A: control; B: 30 minutes after nifedipine addition, C: 60 minutes after nifedipine addition.

INFLUENCE OF NIFEDIPINE ON THE NEUROMUSCULAR BLOCK PRODUCED
BY ATRACURIUM AND CISTRACURIUM. STUDY IN RAT
PHRENIC-DIAPHRAGMATIC NERVE PREPARATION

DISCUSSION

There are evidences that calcium channel blockers may interact and increase the effects of neuromuscular blockers commonly used on general anesthesia^{4,9,12,17-20}. These effects were experimentally proved in isolated preparation, on intact animal and they were also confirmed at the clinical practice, on a patient with Duchenne muscular dystrophy who developed acute respiratory failure after the administration of verapamil to treat atrial flutter^{2-4,8-14,17,18,21}, as well as a higher difficulty to antagonize neuromuscular blockage on a patient chronically treated with verapamil. Those interurrences are attributed to the neuromuscular blockage property of verapamil²². The use of a separated nerve – muscle preparation (*in vitro*), properly aerated and kept at a constant temperature make it possible to evaluate the nifedipine and neuromuscular effects over muscular responses to indirect stimulation, excluding any other factors that may interfere on neuromuscular transmission. Besides, experiments performed on rats are considered more appropriate to investigate postsynaptic events when compared to the tests performed on dogs⁹.

Although the effects of calcium channel blockers have been extensively investigated on cardiac, vascular smooth, respiratory, and intestinal muscles, there are only a few studies about the action of these drugs on neuromuscular activity. The skeleton muscle contains calcium channels of the slow type, similar to the ones observed on cardiac and vascular smooth muscles, with special connection sites for calcium channel blockers. On vascular smooth and cardiac muscles, those channels are located all over the muscular membrane and display a high sensitivity to calcium channel blockers, while on skeleton muscle they present lesser sensitivity and are located on the transverse tubular system²³. Due to these particularities, some physiologic processes on neuromuscular junction or at the muscle may be altered by these drugs.

The choice of neuromuscular blockers dose was established on a pilot project and then adjusted until obtaining a neuromuscular blockage which progressively installs itself during 45 minutes. Nifedipine concentration used on this study was $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, determined from the data presented on studies by Bikhazi et al⁹. The separate use of nifedipine did not produce any compromising of neuromuscular transmission, this result being similar to the ones observed on other research works^{1,9}. These authors reported on experiments performed *in vitro* and *in vivo* that nifedipine and verapamil produced minimal or no change on the muscular responses to isolated stimuli. However, these results are opposed to the ones obtained by Del Pozo and Baeyens⁵, who studied on rat's phrenic-nerve diaphragm preparation the effects of several nifedipine, verapamil and diltiazem concentrations and observed a concentration-dependant decrease of the diaphragm muscle answer to indirect stimulation. Similar results were also proved on other experimental studies using other calcium channel blockers^{2-4,17}.

On the likeness of prior studies, nifedipine increase the neuromuscular blockage produced by atracurium and by cistracurium. Verapamil or nifedipine concentrations (*in vitro*) or doses (*in vivo*) that separately presented little or no effect on muscular response increase the power of atracurium, vecuronium and pancuronium, fact proved by a DE_{50} decrease of these

drugs. This is considered a more than additive effect^{1,9}.

Although the reasons for this interaction and increase of neuromuscular blockage are not fully elucidated, several mechanisms have been proposed in order to explain it. Some research works performed *in vivo* and *in vitro* suggest that calcium channel blockers prevent the calcium inflow through the membranes of calcium slow channels, altering calcium and presynaptic cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentrations. This harms the neurotransmitter mobilization and liberation, consequently inhibiting neuromuscular transmission and muscular contraction^{3,4,14,17-19,24-27}. These drugs also display a local anesthetic activity that may contribute to generate a depressor effect on muscular contraction, probable due to its action on the sodium fast channel^{15,17,21}. It has been reported on literature that verapamil reduces the acetylcholine release on motor nerve ending, suggesting a presynaptic action^{4,21,25}. In other works, several explanations have been proposed for the direct effects of verapamil on skeletal muscle. Acting at calcium channels on the skeleton muscle, this drug prevents calcium entrance on muscular cells, impairing the activation mechanism and consequently the exciting-contraction process^{13,28,29}. Alternatively, Chiarandini and Bentley³⁰ reported that verapamil, on toad preparation, blocks the muscular response induced by acetylcholine and suggests that, on a similar way to nondepolarizing neuromuscular blockers, it may have an effect on the ionic channels activated by acetylcholine on the end plate, reflecting a postjunctional effect^{1,30}. On the other hand, results about the inhibitory effects of verapamil on muscular response to indirect stimulation are higher than the ones obtained with direct stimuli. It may mean that the calcium channel blocker also act directly at the nerve^{3,19}.

When assessing bioelectrical potentials, it was noted that nifedipine, on the employed concentration, does not alter the membrane potential of muscular fibers; therefore demonstrating that it has no depolarizing action over the skeleton muscular fiber. However, it was noted an influence on the miniature end-plate potentials (mepps), which may be attributed to a possible presynaptic action.

At some moment, anesthesiologists may come across this interaction when performing anesthesia on patients with chronic use of calcium channel blockers or even when there is a need to use these drugs on the treatment of cardiocirculatory complications during surgery. Results of *in vitro* studies with the association between calcium channel blockers and neuromuscular blockers suggest that the interaction between these two groups of drugs may differ according to the usage form of the calcium channel blocker. On patients with chronic use of calcium channel antagonist, these drugs may accumulate on the muscles and a great part of the blockage may be attributed to the calcium antagonist. Its administration during anesthesia may temporarily increase the degree of neuromuscular blockage, however with no increase in the action duration⁹. Results show that nifedipine, on the employed concentration, increases the neuromuscular blockage produced by atracurium and cistracurium. Alterations of the miniature end-plate potentials exteriorize a presynaptic action and the absence of effect on membrane potential proves that it has no depolarizing action on the muscular fiber.

REFERÊNCIAS - REFERENCES

01. Bikhazi GB, Flores C, Foldes FF - The effect of verapamil and EGTA on the rat phrenic nerve hemidiaphragm preparation. *Anesth Analg*, 1985; 64: 505-508.
02. Salvador A, del Pozo E, Carlos R et al - Differential effects of calcium channel blocking agents on pancuronium and suxamethonium-induced neuromuscular blockade. *Br J Anaesth*, 1988; 60:495-499.
03. Kraynack BJ, Lawson NW, Gintautas J - Neuromuscular blocking action of verapamil in cats. *Can Anaesth Soc J*, 1983;30:242-247.
04. Kraynack BJ, Lawson NW, Gintautas J et al - Effects of verapamil on indirect muscle twitch responses. *Anesth Analg*, 1983;62:827-830.
05. Del Pozo E, Baeyens JM - Effects of calcium channel blockers on neuromuscular blockade induced by aminoglycoside antibiotics. *Eur J Pharmacol*, 1986;128:49-54.
06. Bondi AY - Effects of verapamil on excitation-contraction coupling in frog sartorius muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 1978;205:49-57.
07. Sato T, Ono H - Demonstration of slow channel activation in skeletal muscle of the dog. *Eur J Pharmacol*, 1982;83:177-181.
08. Anderson KA, Marshall RJ - Interactions between calcium entry blockers and vecuronium bromide in anaesthetized cats. *Br J Anaesth*, 1985;57:775-781.
09. Bikhazi GB, Leung I, Flores C et al - Potentiation of neuromuscular blocking agents by calcium channel blockers in rats. *Anesth Analg*, 1988; 67:1-8.
10. Durant NN, Nguyen N, Katz RL - Potentiation of neuromuscular blockade by verapamil. *Anesthesiology*, 1984;60:298-303.
11. Zalman F, Perloff JK, Durant NN et al - Acute respiratory failure following intravenous verapamil in Duchenne's muscular dystrophy. *Am Heart J*, 1983;105:510-511.
12. Ilias W, Steinbereithner K - Potentiation of pancuronium induced neuromuscular blockade by calcium channel blockers in vitro. *J Neural Transm*, 1985;64:285-293.
13. Carpenter RL, Mulroy MF - Edrophonium antagonize combined lidocaine-pacuronium and verapamil-pancuronium neuromuscular blockade in cats. *Anesthesiology*, 1986; 65:506-510.
14. Lawson NW, Kraynack BJ, Gintautas J - Neuromuscular and electrocardiographic responses to verapamil in dogs. *Anesth Analg*, 1983;62:50-54.
15. Reves JG, Kissin I, Lell WA et al - Calcium entry blockers: uses and implications for anesthesiologists. *Anesthesiology*, 1982;57:504-518.
16. Bulbring E. Observation on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. *Br J Pharmacol*, 1946;1:38-61.
17. Sekerci S, Tulunay M - Interactions of calcium channel blockers with non-depolarising muscle relaxants in vitro. *Anaesthesia*, 1996;51:140-144.
18. Wali FA - Interaction of verapamil with d-tubocurarine and cholinergic agonists at the avian neuromuscular junction. *Acta Anaesthesiol Scand*, 1987;31:15-20.
19. Wali FA - Verapamil intensifies neuromuscular blockade produced by gallamine and pancuronium at the chick neuromuscular junction. *Pharmacol Res Commun*, 1986;18:529-541.
20. Wali FA - Interaction of verapamil with gallamine and pancuronium and reversal of combined neuromuscular blockade with neostigmine and edrophonium. *Eur J Anaesthesiol*, 1986;3:385-393.
21. Jones RM, Cashman JN, Casson WR et al - Verapamil potentiation of neuromuscular blockade: failure of reversal with neostigmine but prompt reversal with edrophonium. *Anesth Analg*, 1985;64:1021-1025.
22. van Poorten JF, Dhasmana KM, Kuypers RS et al - Verapamil and reversal of vecuronium neuromuscular blockade. *Anesth Analg*, 1984;63:155-157.
23. Nayler WG - Tissue-selectivity. In: Nayler WG - Calcium antagonists, 2nd Ed, London: Harcourt Brace Jovanovich, 1989: 113-129.
24. Ribeiro JA, Dominguez ML, Goncalves MJ - Purine effects at the neuromuscular junction and their modification by theophylline, imidazole and verapamil. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1979; 38:206-219.
25. Standaert FG, Dretchen KL - Cyclic nucleotides in neuromuscular transmission. *Anesth Analg*, 1981;60:91-99.
26. Singh BN, Ellrodt G, Peter CT - Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs*, 1978;15:169-97.
27. Esau SA - Interaction of theophylline, verapamil, and diltiazem on hamster diaphragm muscle force in vitro. *Am J Physiol*, 1988;254: C365-C371.
28. Donaldson PL, Beam KG - Calcium currents in a fast-twitch skeletal muscle of the rat. *J Gen Physiol*, 1983;82:449-468.
29. Walsh KB, Bryant SH, Schwartz A - Effect of calcium antagonist drugs on calcium currents in mammalian skeletal muscle fibers. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986;236:403-407.
30. Chiarandini DJ, Bentley PJ - The effects of verapamil on metabolism and contractility of the toad skeletal muscle. *J Pharmacol Exp Ther*, 1973;186:52-59.

RESUMEN

Sousa SR, Braga AFA, Poterio GMB, Braga FSS, Loyola YCS, Fernandes SCA – Influencia de la Nifedipina en el Bloqueo Neuromuscular Producido por Atracurio y Cisatracurio. Estudio en Preparación Nervio Frénico Diafragma de Ratón.

JUSTIFICATIVA Y OBJETIVOS: Los bloqueadores de canales de calcio pueden reaccionar con los bloqueadores neuromusculares potenciando sus efectos. Los estudios sobre esta interacción presentan resultados controvertidos. En algunos estudios estas drogas produjeron el bloqueo neuromuscular, o contractura, o no se observó ningún efecto sobre las respuestas musculares esqueléticas. El estudio evaluó los efectos de la nifedipina sobre la respuesta muscular y su posible relación con los bloqueadores neuromusculares en el diafragma del ratón.

MÉTODO: Fueron utilizados 25 ratones, con peso entre 250 y 300 g sacrificadas con anestesia con pentobarbital (40 mg.kg⁻¹) por vía intraperitoneal. La preparación fue montada de acuerdo con la técnica descrita por Bulbring. El diafragma fue mantenido bajo tensión, conectado con un transductor isométrico y sometido a estímulo indirecto de 0,1 Hz de frecuencia. Las contracciones del diafragma fueron registradas en un fisiógrafo. Para la evaluación de los efectos de las drogas en la transmisión neuromuscular, las mismas fueron añadidas aisladamente o asociadas a la preparación en las siguientes concentraciones: nifedipina (4 µg.mL⁻¹); atracurio (20 µg.mL⁻¹); cisatracurio (3 µg.mL⁻¹). En las preparaciones nervio frénico-diafragma se evaluaron: 1) la amplitud de las respuestas del músculo diafragma al estímulo indirecto, antes y 45 minutos después de la adición de nifedipina y de los bloqueadores neuromusculares aisladamente y después de la asociación de las drogas; 2) los efectos de la nifedipina en los potenciales de la membrana (PM) y potenciales de la placa terminal en miniatura (PPTM).

INFLUENCE OF NIFEDIPINE ON THE NEUROMUSCULAR BLOCK PRODUCED
BY ATRACURIUM AND CISTRACURIUM. STUDY IN RAT
PHRENIC-DIAPHRAGMATIC NERVE PREPARATION

RESULTADOS: La nifedipina, cuando empleada aisladamente, no cambió la amplitud de las respuestas musculares, pero aumentó significativamente la actividad bloqueadora neuromuscular del atracurio y del cisatracurio, no cambió el potencial de membrana y produjo el aumento inicial en la frecuencia de los PPTM, seguida de bloqueo.

CONCLUSIONES: La nifedipina, en la concentración empleada, potenció el bloqueo neuromuscular que el atracurio e cisatracurio produjeron. Estudios electrofisiológicos demostraron una acción presináptica y la ausencia de acción despolarizante sobre la fibra muscular.