

ANTAGONISMO COMPETITIVO ENTRE PANCURÔNIO(*) E ACETILCOLINA(**)

DR. A.P. CORRADO

DR. I.P. DE MORAIS

DR. W.A. PRADO

NP2009
Empregando técnicas "in vivo" e "in vitro", evidenciamos novos dados miográficos sobre o bloqueio neuromuscular induzido pelo pancurônio e comprovamos que esse agente compete com a acetilcolina pelos receptores colinérgicos, mostrando-se cerca de cinco vezes mais potente do que a d-tubocurarina.

Buckett e col. (3) realizaram estudos pormenorizados sobre as alterações miográficas produzidas pelo pancurônio, que se mostrou potente bloqueador neuromuscular, com características semelhantes às descritas em relação à d-tubocurarina e outros agentes adespolarizantes, inclusive no que diz respeito ao acentuado antagonismo desse bloqueio pela neostigmina. Apesar desse comportamento ter sido extensamente estudado, não encontramos em literatura, dados referentes ao mecanismo de ação desse composto, ao nível dos receptores colinérgicos.

Utilizando preparações "in vivo" — ciático poplíteo externo — tibial anterior de gato — e "in vitro" — reto abdominal isolado de sapo e nervo frênico — diafragma isolado de rato — estudamos, quantitativamente, o antagonismo "pancurônio x acetilcolina". A finalidade do presente é esclarecer qual o tipo de antagonismo envolvido nessa interação, bem como apresentar dados adicionais sobre as alterações

(*) Brometo de pancurônio (2 beta, 16 beta-dipiperidino-5 alfa-androstano-3 alfa, 17 beta-diol diacetato dimetilbrometo) comercialmente denominado Pavulon, gentilmente cedido pelos Laboratórios Organon do Brasil Ltda., São Paulo.

(**) Trabalho do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, apresentado no XI Congresso Latino-Americano de Anestesiologia — Rio de Janeiro — outubro 1971.

miográficas induzidas pelo pancurônio em preparações neuromusculares.

MATERIAL E MÉTODOS

Ciático poplíteo externo — tibial anterior de gato: Cinco animais, de pesos variáveis entre 2 e 3 kg foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (33 mg/kg, i.v.) e preparados para o registro simultâneo da pressão arterial carotídea e do miograma do músculo tibial anterior, de acordo com técnica descrita anteriormente⁽⁸⁾. Ao nervo ciático foram aplicados estímulos supramáximos de 5 milissegundos de duração, com frequência de 30 estímulos por minuto, empregando miógrafo semi-isométrico para o registro das contrações do músculo tibial anterior.

Reto abdominal isolado de sapo: Seis sapos, de pesos variáveis entre 200 e 300 g, foram sacrificados e um de seus músculos retos abdominais foi dissecado, isolado e cuidadosamente retirado. Suas extremidades foram amarradas, sendo uma delas ligada a um suporte fixo de uma cuba para órgãos isolados de 10 ml de capacidade, e a outra conectada a uma alavanca isotônica de inscrição frontal, para o registro de contraturas induzidas pela acetilcolina. No decorrer do experimento a preparação ficou imersa em líquido nutriente (**), sob borbulhamento constante de ar atmosférico e à temperatura ambiente, variável entre 25 e 30°C.

A preparação foi sistematicamente lavada após permanecer em contato com a acetilcolina pelo período constante de 90 segundos. Entre cada ligação sucessiva desse mediador, respeitou-se um período de repouso da preparação por 10 minutos. Procedeu-se, inicialmente, à obtenção das curvas dose-efeito controle de acetilcolina, pela aplicação de doses crescentes do mediador em ausência do composto inibidor. Em seguida, obtiveram-se curvas análogas, porém, em presença de concentrações variáveis de pancurônio.

Para a análise desse antagonismo, aplicamos aos resultados o método das recíprocas⁽⁷⁾, que se baseia nos recíprocas das equações de Clark⁽⁵⁾ e Gaddum,⁽⁶⁾ que regem as interações droga-receptor. A primeira nos permite obter o cálculo da afinidade droga-receptor e a segunda a potência inibitória do agente bloqueador empregado.

(*) «Ringer-rã», componentes em mM/l: NaCl, 154; KCl, 5.63; CaCl₂, 2.20; NaHCO₃, 6.00; dextrose, 5.50.

As relações entre as doses e os respectivos efeitos promovidos pela acetilcolina, seguem a equação de Clark: (5)

$$(I) \quad K_c \cdot x = \frac{y}{1 - y} \quad \text{onde} \quad \begin{array}{l} K_c \text{ — constante de Clark;} \\ x \text{ — dose de acetilcolina;} \\ y \text{ — efeito produzido pelas} \\ \text{— adições de acetilcolina.} \end{array}$$

A recíproca desta equação retifica as curvas dose-efeito, possibilitando o cálculo da constante de afinidade (K_n), que é dada pela inclinação da reta controle:

$$(II) \quad \frac{1}{y} = \frac{K_n}{x} + 1 \quad \text{onde} \quad \begin{array}{l} K_n \text{ — constante de afinidade,} \\ \text{acetilcolina-receptor, re-} \\ \text{cíproca de } K_c; \\ x \text{ — concentração de acetil-} \\ \text{colina;} \\ y \text{ — porcentagem do efeito} \\ \text{máximo.} \end{array}$$

A retificação da curva dose-efeito da acetilcolina, em presença do antagonista, segue a recíproca da equação de Gaddum: (6)

$$(III) \quad \frac{1}{y} = \frac{\beta K_n}{x} + 1 \quad \begin{array}{l} I \text{ — concentração do anta-} \\ \text{gonista;} \\ K_i \text{ — constante de afinidade} \\ \text{antagonista-receptor;} \end{array}$$

em que

$$(IV) \quad \beta = 1 + (I/K_i)^n \quad \begin{array}{l} n \text{ — indica o número de mo-} \\ \text{léculas do antagonista} \\ \text{que interagem com o re-} \\ \text{ceptor colinérgico.} \end{array}$$

O produto βK_n , que representa a inclinação dessa reta, pode também ser obtido graficamente, da mesma forma como é obtido o valor de K_n da reta controle. Desta forma, obtém-se o valor de β , que é a relação entre a tangente da reta "acetilcolina x antagonista" e a tangente da reta controle.

A forma cologarítmica da equação (IV) é expressa por:

$$(V) \quad n p K_i \text{ — } \log (\beta - 1) \text{ — } n \log I$$

Aplicando-se duas concentrações conhecidas do inibidor (1) no antagonismo com a acetilcolina podemos, através desta equação, calcular os valores das constantes n e pK_i .

Nervo frênico — diafragma isolado de rato: Ratos machos, com pesos variáveis entre 250 e 300 g, foram sacri-

ficados e seus diafragmas montados em cuba de 50 ml, segundo método preconizado por Bülbrind, (4). A preparação foi mantida imersa em solução de Tyrode-glicose (*) a 37°C sob borbulhamento constante de uma mistura de oxigênio a 95% e CO₂ a 5%, e estimulada com pulsos elétricos retangulares supramáximos de 0.8 milisegundos de duração, aplicados ao nervo frênico 6 vezes por minuto, através de eletrodos bipolares de platina. As contrações musculares resultantes foram registradas em papel enfumado de quimógrafo Palmer, por intermédio de uma alavanca de Starling.

Três doses crescentes de pancurônio, capazes de produzir bloqueios entre 30 e 70% do bloqueio total, foram adicionadas à cuba em ausência e em presença de duas concentrações de neostigmina (0.025 e 0.0125 mM/1. O agente bloqueador neuromuscular foi deixado atuar durante 3 minutos e, quando do teste com o antagonista, a preparação ficou em contato com o mesmo por 5 minutos. Entre cada dosagem, após 3 lavagens sucessivas da preparação, esperou-se 10 minutos para que o recobro total da mesma fosse obtida.

Para a análise dos resultados obtidos, aplicou-se o método preconizado por Arunlakshana e Schild (1) para a obtenção de índices pA₂ de inibição do pancurônio em relação à neostigmina.

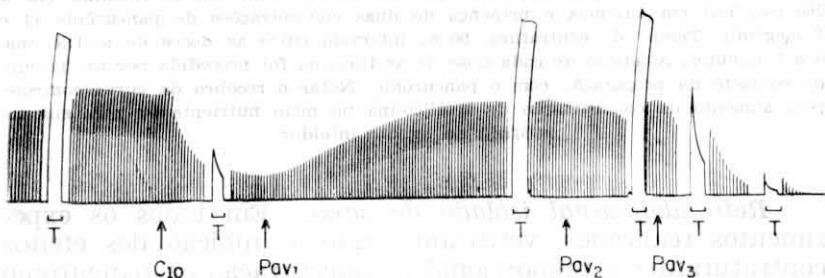


FIGURA 1.

Antagonismo do bloqueio neuromuscular pelo decametônio induzido pelo pancurônio: Preparação ciático poplíteo externo — tibial anterior, de gato com 2,5 kg anestesiado pelo pentobarbital sódico. Em C₁₀, brometo de decametônio 0.05 mg/kg, i.v. Em Pav₁, Pav₂ e Pav₃, respectivamente, 0.003, 0.003 e 0.012 mg/kg, i.v., de brometo de pancurônio e, em T, estímulo de alta frequência (70 c/s).

RESULTADOS

Ciático poplíteo externo — tibial anterior de gato: Além das características miográficas descritas por Buckett e

(*) «Tyrode-glicose», composição em mM/1: NaCl, 3.0; MgCl₂.6H₂O, 1.0; NaHCO₃, 12.0; NaH₂PO₄.H₂O, 0.4; glicose, 11.0.

cols, (3) isto é, bloqueio neuromuscular sem prévia estimulação, potenciação pela d-tubocurarina e seu antagonismo pela neostigmina e succinilcolina, verificamos que o pancurônio, em doses adequadas, é capaz de antagonizar o bloqueio neuromuscular induzido por agentes despolarizantes, como mostra a Figura 1.

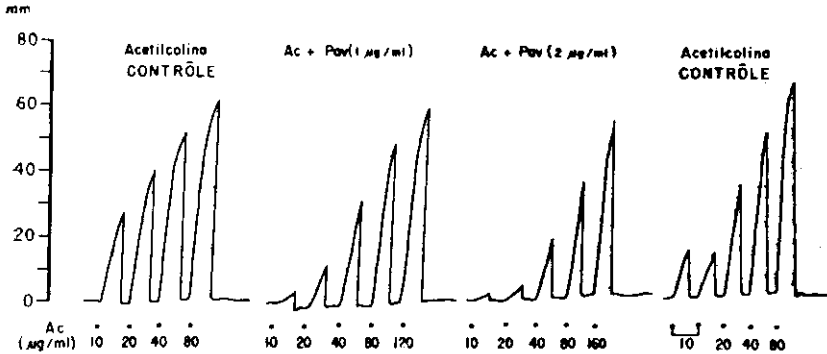


FIGURA 2

Antagonismo pancurônio x acetilcolina no músculo reto abdominal isolado de sapo: Registro das contraturas induzidas por diferentes doses de acetilcolina (10 a 160 mcg/ml) em ausência e presença de duas concentrações de pancurônio (1 e 2 mcg/ml). Tempo de contratura, 90 s; intervalo entre as doses de acetilcolina, 6 a 8 minutos. A adição de cada dose de acetilcolina foi precedida por um minuto de contacto da preparação com o pancurônio. Notar o recóbro da curva contrôlo, pelo aumento da concentração de acetilcolina no meio nutriente ou pela simples retirada do agente inibidor.

Retó abdominal isolado de sapo: Em todos os experimentos realizados, verificamos que a inibição dos efeitos contraturantes é proporcional à concentração de pancurônio empregada. Entretanto, sempre obtivemos o recóbro da resposta máxima, pelo simples aumento da concentração de acetilcolina na cuba de perfusão (Figura 2). As recíprocas das curvas dose-efeito contrôlo e em presença de duas concentrações de pancurônio (1 e 2 microgramas/ml), são apresentadas na Figura 3, onde pode-se observar que o interceptor das mesmas, com o eixo das ordenadas, não é alterado.

Nervo frênico — diafragma isolada de sapo: Curvas de inibição dose-efeito, representativas do bloqueio neuromuscular induzido pelo pancurônio na ausência e presença de neostigmina no líquido de perfusão, revelaram um acentuado paralelismo e possibilitaram a determinação das doses do agente bloqueador neuromuscular, necessárias para produzir 50% de efeito (Figura 4). A razão (x) dessas doses foi, então,

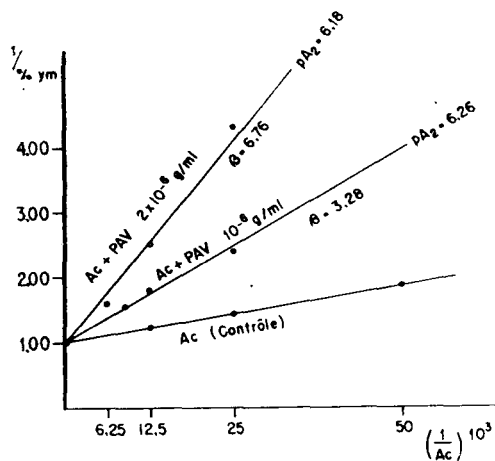


FIGURA 3

Antagonismo pancurônio x acetilcolina no músculo reto abdominal isolado de sapo — Análise segundo método das recíprocas 7: Em ordenadas as recíprocas dos efeitos em termos de porcentagem do efeito máximo (Ym); em abscissas, recíprocas das concentrações de acetilcolina utilizada em ug/ml. Ac = acetilcolina; PAV = pancurônio; PA₂ é o índice de inibição, determinado em g/ml, do pancurônio utilizado.

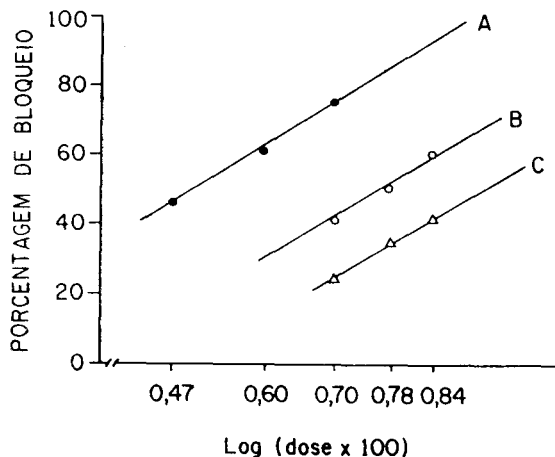


FIGURA 4

Antagonismo pancurônio x acetilcolina na operação nervo frênico-diafragma isolado de rato: Em A, curva controle obtida em ausência de antagonista; em B e C, curvas em presença de concentrações de prostigmina iguais a, respectivamente, 0.0125 e 0.0250 mM/l. Notar o paralelismo entre as retas obtidas, fato sugestivo de um antagonismo do tipo competitivo do pancurônio pelos sítios receptivos colinérgicos. As doses de pancurônio variaram de 3 a 7 x 10⁻⁶ M/l.

lançada em gráfico (Figura 5) como $\log x - 1$, contra o cologarítimo da concentração molar do agente antagonista. (1) A inclinação da reta resultante revelou um ângulo da ordem de 45° e o intercepto da mesma, com o eixo das abcissas, determinou o valor de 6.10, que corresponde ao pA_2 da interação pancurônio x neostigmina.

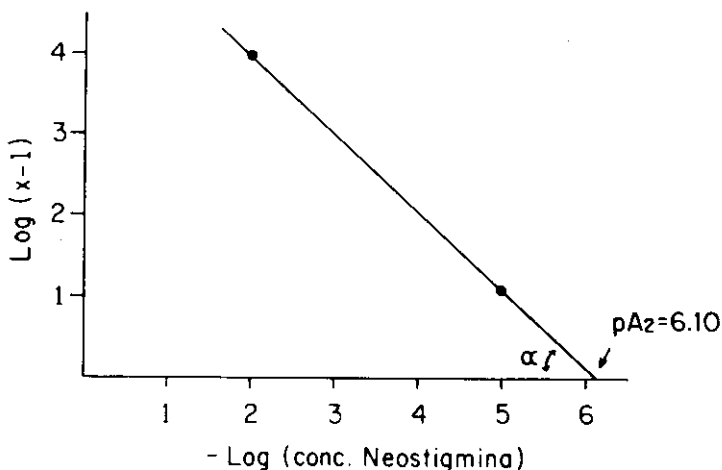


FIGURA 5

Antagonismo pancurônio x acetilcolina na preparação nervo frênico-diafragma isolado de rato — análise segundo método de Arunlakshana e Schild: Notar que a reta obtida mantém com o eixo das abcissas uma inclinação da ordem de 45° ; o que confirma a sugestão da Fig. 4, sobre o mecanismo de natureza competitiva da interação entre o pancurônio e os receptores colinérgicos. O PA_2 , índice de inibição do bloqueador neuromuscular em relação à prostigmina, foi da ordem de 6.10.

DISCUSSÃO

O antagonismo exercido pelo pancurônio ao bloqueio neuromuscular provocado pelo decametônio no músculo tibial anterior de gato (Figura 1), constitui um dado importante na complementação dos trabalhos de Buckett e col. (3) que sugeriram um comportamento do pancurônio análogo ao produzido pela d-tubocurarina e demais agentes adespolarizantes. Dentre as inúmeras semelhanças miográficas assinaladas por estes autores, destaca-se o antagonismo exercido pela succinilcolina sobre o bloqueio neuromuscular induzido pelo pancurônio. A nossa constatação sobre a ocorrência de um antagonismo mútuo, como o obtido por Bowman e col. (2) com a interação d-tubocurarina x despolarizante,

constitui fator primordial para o reforço da sugestão de Buckett e col. ⁽³⁾

A análise quantitativa de nossos resultados, segundo duas formas diferentes de análises, aplicadas aos resultados obtidos de duas diferentes preparações, apolam a referida sugestão. Assim é que, nos resultados dos experimentos com o reto abdominal isolado de sapo, analisados segundo o método das recíprocas, ⁽⁷⁾ obtivemos retas com mesmo intercepto no eixo das ordenadas (Figura 3), fato sugestivo de um antagonismo do tipo competitivo entre o pancurônio e a acetilcolina. Chegamos à mesma conclusão, utilizando o nervo frênico — diafragma isolado de rato, aplicando aos resultados obtidos o método preconizado por Arunlakshana e Schild ⁽¹⁾ obtendo, na contraposição do log (x - 1) com o cologarítmo da concentração do antagonista (Figura 5), uma reta com inclinação de 45°, o que em última análise, significa estar a interação ocorrendo na razão de 1 x 1.

Ficou duplamente comprovado que, de maneira análoga à d-tubocurarina, o antagonismo pancurônio x acetilcolina é do tipo competitivo frizando-se, ainda, que este novo agente bloqueador neuromuscular mostrou ser cerca de 5 vezes mais potente que a d-tubocurarina.

SUMMARY

COMPETITIVE ANTAGONISM BETWEEN PANCURONIUM AND ACETYLCHOLINE

New myographic data on the neuromuscular block induced by pancuronium bromide are presented, employing «in vivo» and «in vitro» techniques. This substance competes with acetylcholine at the cholinergic receptors and is about five times more potent than d-tubocurarine.

REFERENCIAS

1. Arunlakshana O and Schild H O — Some quantitative uses of drugs antagonists. Brit J Pharmacol 14:48, 1959.
2. Bowman W C — Evaluation of drugs activities. Laurence & Bacharach, Ed. 343, 1964.
3. Buckett W R, Marjoribanks C E B, Marwick F A and Morton M B — The pharmacology of pancuronium bromide (Org. NA97), a new potent steroidal neuromuscular blocking agent. Brit J Pharmac Chemother 32:671, 1968.
4. Bulbring E — Observations on the isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of the rat. Brit J. Pharmacol, 1:38, 1946.
5. Clark A J — General pharmacology. Handb exp Pharmacol, Suppl 4:1, 1937.
6. Gaddum J H — The quantitative effects of antagonistic drugs. J Physiol Lond, 138:434, 1937.
7. Rocha e Silva M — Concerning the theory of receptor in pharmacology — A rational method of estimation of pAx. Arch Int Pharmacodyn, 118:74, 1959.
8. Vital Brazil O and Corrado A P — The curariform action of streptomycin. J Pharm Exper Ther 120:452, 1957.