



REVISTA BRASILEIRA DE ANESTESIOLOGIA

Official Publication of the Brazilian Society of Anesthesiology
www.sba.com.br/rba/index.asp



ARTIGO DE REVISÃO

Efeitos Neurotóxicos de Sulfato de Magnésio Intratecal

Levent Ozdogan¹, Handan Sastim¹, Dilsen Ornek*¹, Aysun Postaci¹, Taner Ayerden¹, Bayazit Dikmen¹

1. Departamento de Anestesiologia e Reanimacao, Hospital de Treinamento e Pesquisa Ancara Numune, Ancara, Turquia. Recebido do Departamento de Anestesiologia e Reanimacao, Hospital de Treinamento e Pesquisa Ancara Numune, Ancara, Turquia.

Submetido em 3 de janeiro de 2012. Aprovado para publicacao em 27 de fevereiro de 2012.

Unitermos:

Infusão Espinal;
Microscopia Eletrônica;
Sulfato de Magnésio;
Toxicidade.

Resumo

Justificativa e objetivos: Avaliar os potenciais efeitos neurotóxicos em nível ultraestrutural de sulfato de magnésio administrado por via intratecal em dose única ou múltipla.

Métodos: Estudo realizado com 24 ratos Sprague-Dawley, peso médio entre 250 e 300 g. Após jejum de 4 horas, os ratos receberam 10 mg.kg⁻¹ de cloreto de xilazina por via intraperitoneal e, em seguida, foram divididos aleatoriamente em três grupos. Grupo I (n = 8) recebeu 0,9% de soro fisiológico normal, Grupo II (n = 8) recebeu uma injeção de 0,02 mL de sulfato de magnésio a 15% por via intratecal e Grupo III (n = 8) recebeu 0,02 mL de sulfato de magnésio a 15% uma vez por dia durante sete dias. As injeções foram aplicadas dentro de 0,40x50 milímetros da área lombar. Após sete dias, os animais foram sacrificados sob anestesia com uma injeção de formaldeído a 10% na aorta e os tecidos foram fixados. A medula espinal foi, então, examinada e histopatologicamente avaliada sob microscópio eletrônico. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para avaliação estatística. Um valor de p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Resultados: Neurodegeneração significativa foi detectada nos ratos que receberam uma única injeção ou injeções repetidas de sulfato de magnésio, em comparação com o grupo controle. O escore na avaliação histopatológica desse grupo também foi alto.

Conclusão: Com base no exame de microscopia eletrônica, descobrimos que a administração intratecal de sulfato de magnésio induziu neurodegeneração.

© 2013 Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Publicado pela Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Introdução

A descoberta de receptores de opioides no interior da medula espinal tornou os métodos de administração de medicamentos por via intratecal ou epidural mundialmente usados para

tratamento de dor aguda ou crônica¹. O sulfato de magnésio, usado há muitos anos em pré-eclâmpsia e eclâmpsia como anticonvulsivo, também está sendo usado para tratar o infarto do miocárdio, algumas arritmias, asma, feocromocitoma e tétano. Além disso, o sulfato de magnésio, considerado como um bloqueador natural dos canais de cálcio, é um antagonista não competitivo dos receptores N-metil-D-aspartato². Estudos anteriores sugeriram que o sulfato de magnésio tem um efeito analgésico pós-operatório quando administrado por via intravenosa³. Além disso, o sulfato de magnésio já foi usado anteriormente em seres humanos e animais por

*Correspondência para: Anaesthesia and Reanimation Department
Ankara Numune Training and Research Hospital Ulku Mahallesi
Talatpasa Bulvari No: 5, Altindag Ankara 06100, Turquia
E-mail: dilsenpinar@yahoo.com

via intratecal por causa de seus efeitos analgésicos e neuroprotetores^{4,5}. Contudo, sabe-se que sequelas neurológicas permanentes podem surgir após administração espinal ou epidural do medicamento⁶.

O objetivo deste estudo foi investigar os potenciais efeitos neurotóxicos da administração intratecal de sulfato de magnésio em nível ultraestrutural.

Materiais e métodos

Este estudo foi conduzido no laboratório de estudos em animais da Faculdade de Medicina Militar Gülhane com o consentimento do Comitê de Ética da Faculdade de Veterinária da Universidade de Ancara. Foram incluídos no estudo 24 ratos machos da raça Sprague-Dawley (peso 250-300 g). Os ratos foram alimentados com 20% de ração proteica e água fornecida *ad libitum*, de acordo com os critérios de uso e supervisão de animais de laboratório. Antes do experimento, os animais foram mantidos em uma programação de 12h:12h, noite/dia, em condições ótimas a 20-22°C e 55% de umidade. Durante as experiências, as mesmas condições foram mantidas com os ratos alojados separadamente em gaiolas de policarbonato.

Após jejum de 4 horas, os ratos receberam uma injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina (100 mg.kg⁻¹) e cloreto de xilazina (10 mg.kg⁻¹). Depois de anestesiados, os ratos tiveram os dorsos raspados, higienizados e submetidos a aplicação intratecal (área de 0,40x50 milímetros das vértebras lombares L5-L6). Depois de observar o líquido cefalorraquidiano (LCR), 0,02 mL da solução em estudo foi administrado através de um injetor Hamilton (calibre 28, pontiagudo, SGE, Austrália). Após a administração intratecal, os ratos foram observados para toxicidade clínica até começarem a andar por conta própria e consumirem alimento.

Os ratos foram aleatoriamente divididos em três grupos para receber injeções por via intratecal. O Grupo I (n = 8) recebeu 0,02 mL de soro fisiológico normal a 0,9%, o Grupo II (n = 8) 0,02 mL de sulfato de magnésio a 15% e o Grupo III (n = 8) 0,02 mL de sulfato de magnésio uma vez por dia durante sete dias. Cada injeção foi administrada em área lombar dentro de uma região de 0,40x50 milímetros. Logo após a observação de mobilidade para sinais de toxicidade clínica, todos os ratos foram mortos sob anestesia no oitavo dia, com uma injeção de formaldeído a 10% na aorta e, em seguida, as medulas espinhais foram analisadas.

Amostras de tecido (1 mm³) da região lombar foram incubadas por duas horas em glutaraldeído a 2% (pH 7,4) e solução salina tamponada com fosfato (PBS). No fim da incubação, os tecidos foram lavados três vezes com PBS e, em seguida, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por uma hora. As amostras de tecidos foram então desidratadas em série de álcoois. Por fim, os tecidos foram tratados com óxido de propileno e depois montados em blocos de tecidos com o uso do kit de resina epóxi (Araldite CY212 5x100 g). Metade das incisões no músculo grácil foi feita nos blocos, que foram polimerizados a 56°C e corados com azul de toluidina. O músculo grácil foi então isolado das áreas marcadas após avaliação em microscopia de luz, corado com acetato de urânio e citrato de chumbo e depois avaliado em microscópio eletrônico de transmissão Carl Zeiss, modelo EM 900.

Alterações histopatológicas

Os escores das alterações histopatológicas foram os seguintes: ultraestrutura normal (= 0); alterações degenerativas na mitocôndria onde o conteúdo do núcleo e outras organelas estavam normais (= 1) e degeneração mitocondrial com estruturas desordenadas no retículo endoplasmático granular (REG), defeito no conteúdo do núcleo ou edema extracelular². Um valor de 0,5 também foi usado entre os achados de 0 e 1, bem como de 1 e 2.

Avaliação estatística

O teste de Kruskal-Wallis foi usado para determinar as diferenças significantes entre os dois grupos. Quando uma diferença intergrupos foi detectada, o teste de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis foi aplicado para determinar o grupo responsável pela diferença. Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

Durante a observação no fim do estudo, a mobilidade diurna dos ratos dos grupos I e III e dos ratos em todos os grupos estava normal. Nenhum dos animais foi excluído do estudo por qualquer razão. Não houve diferença estatística entre os ratos nos três grupos em relação ao peso antes do estudo (Tabela 1, $p > 0,05$). O valor médio obtido a partir de exames histopatológicos foi de 0 (0-0,5) no grupo controle, 1 (1-1) no Grupo II e 2 (1,5-2) no Grupo III.

Houve diferença estatisticamente significativa nos índices de toxicidade entre os três grupos (Figura 1A, $p < 0,001$). A toxicidade foi significativamente maior em ratos tratados com dose única de sulfato de magnésio comparados com o grupo controle (Figura 1B, $p = 0,002$). Além disso, os ratos que receberam doses repetidas de sulfato de magnésio apresentaram toxicidade mais elevada do que os controles (Figura 1C, $p = 0,002$). A toxicidade também foi maior nos ratos que receberam doses repetidas de sulfato de magnésio em comparação com os ratos que receberam uma única dose (Grupo II versus III, respectivamente; Figura 1D, $p = 0,008$).

Ao exame de microscopia eletrônica da medula espinhal, neurônios multipolares com estruturas normais foram observados nos ratos controle e o núcleo da célula era cicloide, centralmente localizado e eucromático. Os nucléolo também era conspicuo e o citoplasma da célula continha cisternas do retículo endoplasmático que estavam maduras. A intensidade dos elétrons era dependente da intensidade do ribossomo. As mitocôndrias apresentavam estruturas e crista normais (Figura 2).

No Grupo II, a intensidade dos elétrons era dependente da intensidade dos ribossomos. O núcleo e o nucléolo da célula apresentavam estruturas normais e os grânulos e as cisternas do retículo endoplasmático no citoplasma estavam maduros. Esses achados foram semelhantes aos do grupo controle. Porém, quando as mitocôndrias foram analisadas, observou-se degeneração generalizada e a distensão e a cristalização das mitocôndrias estavam amplamente disseminadas (Figura 3).

No Grupo III, alterações degenerativas muito distintas foram observadas. A perda de cromatina era evidente no núcleo, o que não foi observado. Diminuição da densidade citoplasmática foi observada e dilatação conspicua foi detectada

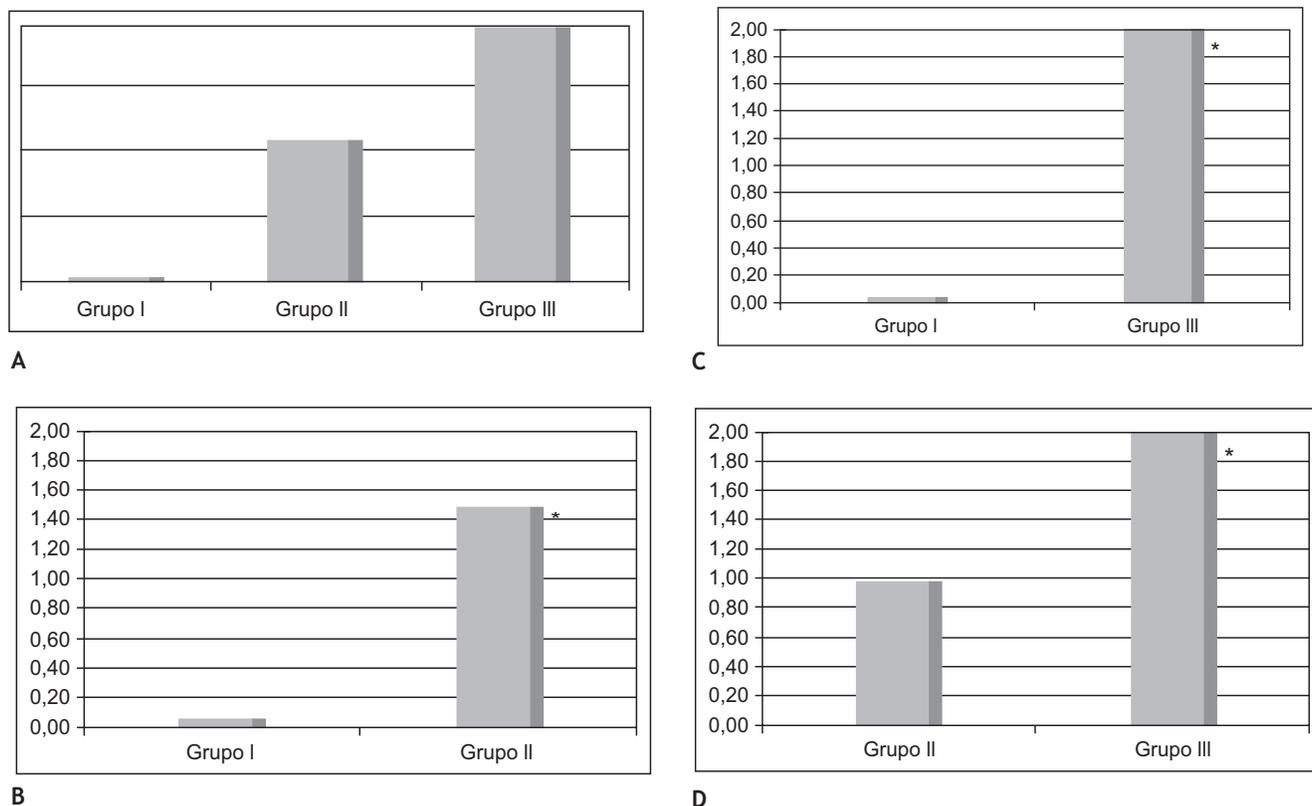


Figura 1 A) Escore de Toxicidade dos Grupos I, II e III. B) Comparação dos Escores de Toxicidade dos Grupos I e II. C) Comparação dos Escores de Toxicidade dos Grupos I e III. D) Escores de Toxicidade dos Grupos II e III.

Tabela 1 Peso Corporal dos Ratos Antes e Depois do Estudo.

Nº	Grupo	Peso Corporal Primeiro dia (g)	Peso Corporal Último dia (g)	P
I	Controle	268 ± 17	269 ± 14	> 0,05
II	Dose única	271 ± 16	273 ± 15	> 0,05
III	Dose repetida	265 ± 17	266 ± 15	> 0,05

em cisternas do retículo endoplasmático. Cristalização em formas diferentes foi observada na mitocôndria e alterações degenerativas muito significantes foram observadas nos neurônios. As células examinadas do Grupo III também apresentaram um aumento incomum nos lisossomos (Figura 4). Com base nessas observações, a neurodegeneração ultraestrutural foi concluída nesse grupo.

Discussão

A ausência de efeitos colaterais graves e o aumento do uso para indicações em analgesia tornaram o uso do sulfato de magnésio administrado por via intravenosa um objeto comum de estudos científicos. Mais recentemente, o uso do sulfato de magnésio vem sendo explorado também em anestesia geral^{7,8}. O sulfato de magnésio é reconhecido como um antagonista dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) e pode bloquear os canais iônicos associados a esses receptores. Os receptores antagonistas de NMDA podem bloquear a sensibilidade central associada ao

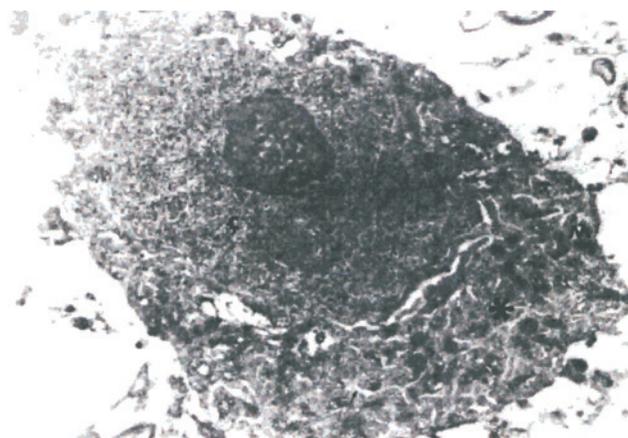


Figura 2 Microscopia Eletrônica de Neurônios. N: núcleo; GER: Retículo Endoplasmático Rugoso; M: mitocôndrias; (*) intensidade citoplasmática à microscopia eletrônica. Examinado em vista normal (acetato de uranila-citrato de chumbo 440x2,10 µm).

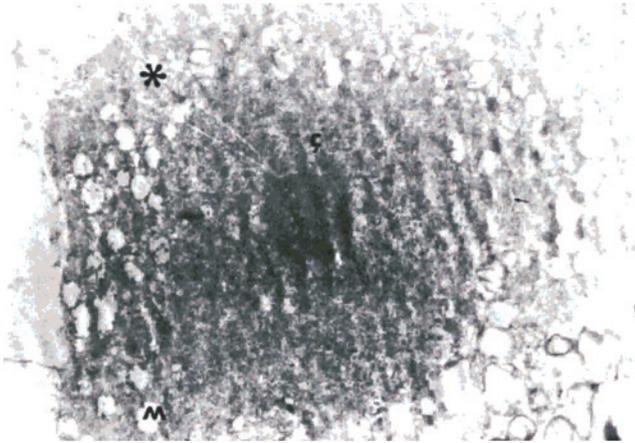


Figura 3 Microscopia Eletrônica de Neurônios no Grupo Submetido à Dose Única de Sulfato de Magnésio.

N: núcleo; GER: Retículo Endoplasmático Rugoso; (*) intensidade citoplasmática à microscopia eletrônica. Todos em estrutura normal. São observados cristais na mitocôndria (acetato de uranila-citrato de chumbo 440x2,10 µm).

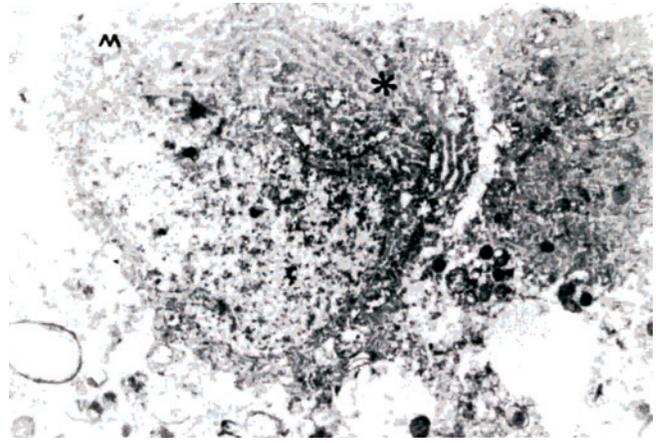


Figura 4 Perda de Cromatina, Dilatação GER: (Retículo Endoplasmático Rugoso), Redução da Intensidade Citoplasmática (*) e Cristais Visíveis no Núcleo dos Neurônios do Grupo Submetido à Aplicação Repetida de Sulfato de Magnésio (acetato de uranila-citrato de chumbo 440x2,10 µm).

estímulo nociceptivo periférico. Estudos mostram que os receptores antagonistas de NMDA têm pouco efeito direto sobre as fibras C, condutoras de dor, mas seu efeito pode aumentar substancialmente durante estimulação repetida⁹. Um estudo realizado por Mitani e col.¹⁰ demonstrou que alterações funcionais nos canais dos receptores de NMDA podem desempenhar papéis específicos na lesão neuronal. Estudos anteriores mostram que o magnésio pode reduzir a liberação de acetilcolina¹¹. Porque o sulfato de magnésio deprime o tônus colinérgico, esse mecanismo pode desempenhar um papel na formação do bloqueio motor¹². Por outro lado, Cheng e col.¹¹ sugerem que o glutamato pode aumentar a concentração intracelular de magnésio, o que pode provocar neurotoxicidade.

No estudo de caso conduzido por Dror e col.⁴, verificou-se que quando o sulfato de magnésio a 10% foi administrado via epidural por engano, uma irritação semelhante à queimadura foi relatada, mas o bloqueio sensorio-motor não ocorreu. Em outro caso, uma injeção intratecal de 2 mL de sulfato de magnésio a 50% administrada por engano causou paralisia motora por 5 horas e intensa dor de cabeça, mas sem qualquer perda de sensação⁵.

Em ratos submetidos à raquianestesia com injeções intratecais em série de sulfato de magnésio, observou-se mais vacuolização nas células ganglionares da massa cinzenta no grupo que recebeu 0,02 mL de sulfato de magnésio a 12,6% do que nos grupos que receberam 6,3% de sulfato, 2% de lidocaína, 0,9% de SF ou apenas com um cateter intratecal implantado¹³. Em outro estudo, os ratos que receberam 6,3% de sulfato de magnésio via cateter intratecal apresentaram anestesia espinal e sedação geral durante o período de uma semana em comparação com ratos que receberam lidocaína a 2%¹⁴. Além disso, os ratos que receberam sulfato de magnésio desenvolveram neurotoxicidade clínica e déficit neurológico.

As lesões nervosas podem ser de origem isquêmica, traumática ou tóxica. Essas lesões podem envolver a toxicidade dos axônios espinhais e muitos componentes do sistema

nervoso que podem afetar diretamente as túnicas, como lesões vasculares e tecido cicatricial. Alguns anestésicos locais podem reduzir o fluxo sanguíneo e têm efeitos tóxicos^{15,16}. Além disso, a influência neurotóxica pode afetar não só a formação citoplasmática, mas também o núcleo diretamente¹⁷.

Vários estudos anteriores de neurotoxicidade¹⁸⁻²⁰ avaliaram injeções de dose única e múltiplas doses via cateter intratecal ou peridural. Devido ao consenso de que o uso de cateteres intratecais também pode causar mudanças histopatológicas, nós submetemos um grupo do estudo a um regime de doses repetidas, bem como a um regime de dose única, porque ambos são usados rotineiramente na prática clínica. Em estudos recentes, a formação de granulação epidural, e fibrinólise maciça nas raízes espinhais bem como na medula espinal, foram observadas em modelos animais submetidos à canulação intratecal e administração de fármaco nos espaços subaracnoide e epidural. Infarto do parênquima e abscesso também foram observados durante a infusão de fármacos sintéticos. No entanto, como algumas dessas mudanças também estavam presentes nos animais do grupo controle, que receberam apenas soro fisiológico, é bastante difícil distinguir as alterações induzidas pelo fármaco de outras alterações por causa do uso crônico do cateter sozinho. Além disso, algumas evidências indicam que o próprio cateter pode bloquear a drenagem do LCR e causar alterações relacionadas a essa condição²¹.

Não está claro se os estudos morfológicos usados para determinar os efeitos neurotóxicos do composto por meio de uma administração intratecal são suficientes, porque as toxicidades mediadas pelo composto podem ter mais de um efeito na função celular do que na estrutura da célula. A ausência de alterações morfológicas não é suficiente para determinar se um composto tem um efeito neurotóxico em potencial. Portanto, os estudos morfológicos e funcionais devem ser realizados concomitantemente durante a análise toxicológica de um composto preparado para uso humano²².

Neste estudo, uma neurodegeneração significativa foi observada após a administração de sulfato de magnésio, especialmente durante a administração de doses repetidas. Essa degeneração pode ser o resultado de um aumento extremo na atividade celular e déficit simultâneo no metabolismo de energia. Essa degeneração não só afeta a estrutura citoplasmática, mas também pode afetar o núcleo. Portanto, o acúmulo intracelular de magnésio também pode ser responsável pela neurodegeneração.

Acredita-se que os efeitos neurotóxicos estejam associados a uma concentração dos agentes previamente administrados²³. Porém, em alguns casos, os compostos que demonstraram uma potencial neurotoxicidade em modelos animais acabam sendo clinicamente seguros em humanos, em determinadas doses ou concentrações²⁴. No presente estudo, sugerimos que a administração intratecal de sulfato de magnésio em concentrações de 15% ou mais pode causar riscos imprevistos para o paciente.

Neste estudo, os ratos não apresentaram distúrbios da motilidade após a administração intratecal de sulfato de magnésio. No entanto, com base no exame microscópico de cada grupo, a nossa hipótese é que a neurodegeneração observada ainda é significativa, especialmente na administração repetida de sulfato de magnésio a 15%. Além disso, o efeito que essa dosagem pode causar na barreira hematoencefálica, na corrente sanguínea e nas conduções nervosas é desconhecido, pois estudos neurofisiológicos não puderam ser feitos por causa de dificuldades técnicas. Nos casos em que a administração de sulfato de magnésio pode ser clinicamente útil, como nas dores com aumentos progressivos que não respondem a opioides²⁵, o uso a longo prazo pode ser necessário. Até o momento, não encontramos qualquer estudo neurofisiológico relacionado ao uso intratecal de sulfato de magnésio em animais de experimentação.

Em conclusão, este estudo sugere que a administração intratecal de sulfato de magnésio em concentrações de 15% ou mais pode causar riscos imprevisíveis para o paciente. Neurodegeneração foi observada por microscopia eletrônica em animais que receberam sulfato de magnésio nessa concentração, especialmente após a administração repetida, e pode resultar em aumento extremo da atividade celular e subsequente déficit no metabolismo de energia. Até o momento, os estudos neurofisiológicos relacionados ao uso de sulfato de magnésio são insuficientes para avaliar a segurança clínica e, portanto, estudos adicionais são necessários para uma caracterização completa.

Referências

1. Barash PG, Cullen BF, Stoelting RF - Handbook of clinical anesthesia, management of acute post-operative pain. 3rd ed. Philadelphia. J.B. Lippincott Company 1997; pp. 1547-1577.
2. Asokumar B, McCarthy RJ, Korin JS, Leong W, Perry P, Tuman KJ - Intrathecal magnesium prolongs fentanyl analgesia. *Anesth Analg*, 2002;95:661-666.
3. Ko S, Lim H, Kim D, Han Y, Choe H, Song H - Magnesium sulphate does not reduce postoperative analgesic requirements. *Anesthesiology*, 2001;95:640-646.
4. Dror A, Henriksen E - Accidental epidural magnesium sulphate injection. *Anesth Analg*, 1987;66:1020-1021.
5. Lejoste MJ - Inadvertent intrathecal administration of magnesium of magnesium sulphate. *S Afr Med J*, 1985;68(6):367-368.
6. Uğur G, Erhan Y, Yegül I - Effects of two different anesthetic medicine on spinal cord and nerve roots. *Ege University, Medical Faculty Journal*, 1985;24:221-236.
7. Meltzer SJ, Auer J - Physiological and pharmacological studies of magnesium salts. 2. The toxicity of intravenous injections, in particular the effects upon the centers of the medulla. *Am J Physiol*, 1996;15:387-405.
8. Zalago G, Eisenach JC - Magnesium, anesthesia, and hemodynamic control. *Anesthesiology*, 1991;74:1-10.
9. Bahar M, Berman S, Chanimov M, Weissgarten J, Averbukh Z, Cohen ML - Intrathecal anesthesia alters intracellular calcium/magnesium homeostasis in the spinal cord neurons of experimental rats. *European Journal of Anesthesiology*, 2001;18:231-237.
10. Mitani A, Watanabe M, Kataoka K - Functional change of NMDA receptors related to enhancement of susceptibility to neurotoxicity in the developing pontine nucleus. *J Neurosci*, 1998;18(19):7941-7952.
11. Fawcett WJ, Haxby EJ, Male DA - Magnesium physiology and pharmacology. 1990;83:302-320.
12. Martyn JA, Standaert FG, Miller RD - Neuromuscular physiology and pharmacology. In: Miller RD (ed). *Anesthesia*, 5th ed. USA, Churchill Livingstone Inc. 2000; pp. 735-751.
13. Chanimov M, Cohen ML, Grinspun Y, Herbert M, Reif R, Kaufman I, Bahar M - Neurotoxicity after spinal anesthesia induced by serial intrathecal injections of magnesium sulphate. *Anaesthesia*, 1997;52:223-228.
14. Bahar M, Chanimov M, Grinspun E, Koafman I, Cohen ML - Spinal anaesthesia by intrathecal magnesium sulphate. *Anaesthesia*, 1996;51:627-633.
15. Diba A - Magnesium sulphate spinal anesthesia. Correspondence. *Anaesthesia*, 1997;52:187-188.
16. Koinig H, Wallner T, Marhofer P, Andel H, Hörauf K, Mayer N - Magnesium sulphate reduces intra and postoperative analgesic requirements. *Anesth Analg*, 1998;87:206-210.
17. Cheng C, Reynolds IJ - Subcellular localization of glutamate stimulated intracellular magnesium concentration changes in cultured rat forebrain neurons using confocal microscopy. *Neuroscience*, 2000;95(4):973-979.
18. Nuutinen L, Laitinen J - A risk-benefit appraisal of injectable NSAID's in the management of postoperative pain. *Drug Safety*, 1993;9(5):380-393.
19. Ready LB, Plummer MH, Haschke RH - Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology*, 1985;63:364-370.
20. Malinovsky JM, Lepage JY, Cozian A, Mussini JM, Pinaud M - Is ketamine or its preservative responsible for neurotoxicity in the rabbit? *Anesthesiology*, 1993;78:109-115.
21. Coombs DW, Fratkin JD - Neurotoxicology of spinal agents. *Anesthesiology*, 1987;66:724-726.
22. Gordh T Jr, Post C, Olsson Y - Evaluation of the toxicity of subarachnoid clonidine, guanfacine and a substance P antagonist on rat spinal cord and nerve roots. *Anesth Analg*, 1986;65:1303-1311.
23. Myers R, Kalichman M, Reisner L, Powell H - Neurotoxicity of local anesthetics. Altered perineural permeability, edema, and nerve fiber injury. *Anesthesiology*, 1986;64:29-35.
24. Rodgson PS, Neal JM, Pollock JE, Liu S - The neurotoxicity of drugs given intrathecally. *Anesth Analg*, 1999;88:797-809.
25. Pockett S - Spinal cord synaptic plasticity and chronic pain. *Anesth Analg*, 1995;80:173-179.