

ANA MARIA TRINDADE GRÉGIO

**ESTUDOS SOBRE OS MECANISMOS
ENVOLVIDOS NO AUMENTO DA AMPLITUDE
DAS RESPOSTAS MUSCULARES
ESQUELÉTICAS INDUZIDO PELA QUINIDINA**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

Campinas
1995

G861e

26672/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Marcos Dias Fontana

Membros:

1. Prof. Dr. Marcos Dias Fontana *Fontana*
2. Prof. Dr. Antônio Carlos Oliveira *Oliveira*
3. Prof. Dr. Leá Rodrigues Simioni *Simioni*

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

Data 14/12/95

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Ana Maria Trindade Grégio.

Campinas, 14 de dezembro de 1995

Prof. Dr. Marcos Dias Fontana
- Orientador -

Fontana

*“Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha,
porque alta vive”.*

Fernando Pessoa

Aos meus pais que sempre estiveram do meu lado, prontos para lutar pela minha felicidade.

*E uma mulher que carregava o filho nos braços, disse:
"Fala-nos dos filhos". "Vossos filhos não são vossos filhos.
São os filhos e as filhas da ânsia da vida por si mesma.
Vem através de vós, mas não de vós.
Embora vivam convosco, não vos pertencem.
Podeis outorgar-lhes o vosso amor, mas não vossos
pensamentos, porque eles tem seus próprios pensamentos.
Podeis abrigar seus corpos, mas não suas almas,
pois suas almas moram na mansão do amanhã, que vós não podeis
visitar nem mesmo em sonho.
Podeis esforçar-vos por ser como eles, mas não procurareis
fazê-los como vós, porque a vida não anda para trás e não se
demora com os dias passados.
Vós sois os arcos dos quais vossos filhos são arremessados como
flechas vivas. O arqueiro mira o alvo na senda do infinito e vos
estica com toda a sua força para que suas flechas se projetem,
rápido e para longe.
Que vosso encurvamento na mão do arqueiro seja a vossa alegria.
Pois assim como ele ama a flecha que voa, ama também o arco que
permanece estável".*

Kahlil Gibran

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Marcos Dias Fontana que proporcionou-me crescimento profissional dando-me todo o apoio e respaldo necessários, assim como também crescimento pessoal pelas suas atitudes.

"Minha gratidão à você mestre que, foi na verdadeira acepção da palavra. A você que me tomou como filho dando-me além de informação a formação, e sobretudo além do ensinamento puro e simples, uma parte de você".

À tia Lurdinha, Maria Dulce, Luís Eduardo (Du), Nelsinho, Lilica,
Valter, minhas tias e Marta

*Hoje eu gostaria que vós vibrastes comigo.
Não porque eu venci, mas porque vencemos mais um
desafio em nossas vidas. E que diante dos próximos, Deus
permita estarmos juntos, para mais fortes podermos enfrentá-
los.*

À todos amigos do departamento de Farmacologia que sempre me trataram com carinho.

Ao Professor Doutor Edson Antunes que gentilmente cedeu algumas drogas necessárias para o meu projeto, o qual também sempre pude contar com a sua amizade.

Ao Professor Doutor Antônio Carlos de Oliveira que gentilmente colaborou com a correção desta tese.

Ao Professor Doutor Alexandre P. Corrado que colaborou com o desenvolvimento desta tese.

À Professora Doutora Léa Rodrigues Simioni pelo apoio e incentivo demonstrados nesta tese.

À Professora Doutora Albetiza Lobo Araújo pelo apoio e atenção dispensados nesta tese.

Aos demais docentes do departamento de Farmacologia que sempre dispostos a colaborar com a pesquisa e desenvolvimento científico de todos.

Ao Professor Doutor Aquiles Piedrabuena pelo auxílio nas revisões estatísticas.

À todos os técnicos que colaboraram no decorrer do meu trabalho, em especial ao Gildo e Toninho.

Ao Toninho, tanto pelo apoio técnico, como também pela amizade e companheirismo que torna o laboratório um lugar alegre e divertido.

À todas as "meninas" da secretaria do departamento de Farmacologia que desempenham seu papel com eficiência, sempre nos ajudando.

*“Brinquemos agora de esconder, se te escondes no meu
coração,
não seria difícil encontrar-te, mas se te escondes atrás da
tua própria casca;
Então seria inútil procurar por ti”.*
Kahlil Gilbran

Ao Maurício, Luciana Bizeto, Iramaia, Sissi e a todos outros que formam o departamento de Farmacologia, pela convivência, amizade que torna o nosso dia cada vez mais agradável.

Ao Wellington e ao Anicleto (Nick) que sempre foram atenciosos e gentis comigo.

À Susana e Heloísa que de forma indireta colaboraram com este trabalho, com sua amizade e companheirismo.

Aos meus amigos que sempre deram-me “força” para continuar os meus objetivos e seguir sempre convicta o meu caminho, em especial com muito carinho Márcia e Marijú (zivizinhas) que partilham da minha vida de estudante.

À Dorinha (Abdo), Soraia (Flávio), Susana, que tanto me acompanharam este tempo, sempre trazendo alegria e carinho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

Ao Sérgio que tão eficientemente ajudou na confecção das minhas figuras.

“Quando existe a convicção de que está havendo um avanço diário, mesmo que de um passo apenas, pode-se sentir pela vida uma razão de viver iluminada pela esperança de VENCER”.

M. Tamiguchi

A Deus

“ Obrigado Senhor”, porque plantaste no meu coração a semente de um ideal, porque a fizeste germinar com o sol da minha esperança e a chuva do meu suor, até que rompendo a terra em busca do céu, explodiu em flores, enfim transformados em frutos que hoje colho com a alma repleta de gratidão”.

J. Goetten de B. Santos

Aos animais

"Aqueles que com os olhos humildes nos falaram de sua vontade de viver, àqueles animais, vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humildade, o meu respeito e eterna gratidão".

Sumário

Lista de ilustrações	
Resumo	
1-Introdução	01
2-Objetivos	07
3-Materiais e Métodos:	09
3.1- Preparação nervo frênico diafragma de rato	11
3.2- Preparação diafragma cronicamente desnervado de rato	14
3.3- Estudo do potencial de repouso, potencial de placa terminal em miniatura e potencial de ação	16
3.3.1- Descrição sumária da aparelhagem eletrofisiológica	17
3.3.2- Procedimentos	19
3.3.3- Registro de potencial de membrana	20
3.3.4- Registro de potencial de placa terminal em miniatura	21
3.3.5- Registro de potencial de ação	22

3.4- Drogas utilizadas	23
4-Resultados:	24
4.1- Preparação nervo frênico diafragma de rato	25
4.2- Preparação diafragma cronicamente desnervado de rato	45
4.3- Registro de potenciais bioelétricos	49
4.3.1- Registro de potencial de membrana	49
4.3.2- Registro de potenciais de placa terminal em miniatura	51
4.3.3- Registro de potencial de ação	53
5-Discussão	55
6-Conclusões	63
7-Referências bibliográficas	66
8-Abstract	72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

FIGURAS, TABELAS e GRÁFICOS:

1-FIGURA 1- Esquema do circuito para eletrofisiologia.
página 18

2-TABELA 1- Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sobre a amplitude das respostas musculares indiretas, da preparação nervo frênico diafragma de rato (n=5), analisado através do teste de Dunnett, de comparações múltiplas.
página 26

3-FIGURA 2- Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sobre a amplitude das respostas musculares indiretas da preparação nervo frênico diafragma de rato.
página 27

4-FIGURA 3- Efeito dependente da dose quinidina sobre o aumento da amplitude das respostas musculares indiretas da preparação nervo frênico diafragma de rato.
página 28

5-FIGURA 4- Gráfico relativo ao aumento da amplitude das respostas musculares da preparação nervo frênico diafragma de rato, efeito dependente da dose.
página 29

6-FIGURA 5- Efeito da diminuição do cálcio da solução nutritiva para 0,90 mM sobre as respostas musculares da preparação nervo frênico diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.
página 30

7-FIGURA 6- Efeito da diminuição do cálcio da solução nutritiva para 0,45 mM sobre as respostas musculares da preparação nervo frênico diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.
página 31

8-FIGURA 7- Efeito da diminuição do cálcio da solução nutritiva para 0,90 mM na solução nutritiva sobre as respostas musculares da preparação nervo frênico diafragma de rato em presença de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sob estimulação elétrica indireta.

página 32

9-FIGURA 8- Efeito da diminuição do cálcio da solução 0,45 mM na solução nutritiva sobre as respostas musculares da preparação nervo frênico diafragma de rato em presença de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sob estimulação elétrica indireta.

página 33

10-TABELA 2- Efeito da 4-aminopiridina (53×10^{-6} M) e quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) sobre as respostas musculares da preparação nervo frênico diafragma de rato (n=4), sob estimulação elétrica indireta.

página 36

11-TABELA 3- Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sobre as respostas musculares da preparação nervo frênico diafragma de rato em presença de nifedipina (2×10^{-5} M), sob estimulação elétrica indireta.

página 37

12-FIGURA 9- Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), nas respostas musculares da preparação nervo frênico diafragma de rato curarizado d-Tubocurarina ($14,6 \times 10^{-6}$ M), sob estimulação elétrica direta.

página 38

13-FIGURA 10- Efeito da 4-aminopiridina (53×10^{-6} M), nas respostas musculares da preparação nervo frênico diafragma de rato em presença de d-Tubocurarina ($14,6 \times 10^{-6}$ M), sob estimulação elétrica direta.

página 39

14-FIGURA 11- Efeito da quinidina ($3,74 \times 10^{-6}$ M), nas respostas musculares da preparação nervo frênico diafragma de rato em presença de d-Tubocurarina ($14,6 \times 10^{-6}$ M), sob estimulação elétrica direta.
página 40

15-FIGURA 12- Efeito da cromakalina (1×10^{-4} M), na preparação nervo frênico diafragma de rato, em presença de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sob estimulação elétrica indireta.
página 42

16-TABELA 4- Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) e da cromakalina (1×10^{-4} M), sobre a amplitude das respostas musculares, da preparação nervo frênico diafragma de rato ($n=4$), sob estimulação elétrica indireta.
página 43

17-FIGURA 13- Efeito da cromakalina (1×10^{-4} M), na preparação nervo frênico diafragma de rato, em presença de glibenclamida (1×10^{-5} M), sob estimulação elétrica indireta.
página 44

18-FIGURA 14- Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), na preparação hemidiafragma cronicamente desnervado de rato, sob estimulação elétrica direta.
página 46

19-FIGURA 15- Efeito da quinidina ($3,74 \times 10^{-6}$ M), na preparação hemidiafragma cronicamente desnervado de rato, sob estimulação elétrica direta.
página 47

20-FIGURA 16- Efeito da 4-aminopiridina (53×10^{-6} M), na preparação hemidiafragma cronicamente desnervado de rato, sob estimulação elétrica direta.
página 48

21- TABELA 5- Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sobre o potencial de membrana da preparação nervo frênico diafragma de rato.
página 50

22-FIGURA 17- Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sobre os potenciais de placa terminal em miniatura, na preparação nervo frênico diafragma de rato.
página 52

23-FIGURA 18- Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sobre o potencial de ação muscular, da preparação nervo frênico diafragma de rato.
página 54

RESUMO

Em preparações nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta observou-se aumento na amplitude das respostas musculares utilizando-se a quinidina na dose $1,87 \times 10^{-6}$ M.

A redução do teor de cálcio da solução nutritiva de 1,80 mM para 0,90 mM e 0,45 mM, não interferiu no efeito facilitador da quinidina sobre as contrações musculares.

A nifedipina (2×10^{-5} M), foi ineficaz em impedir o efeito da quinidina sobre as respostas musculares.

A 4-aminopiridina, um bloqueador de canal de potássio, foi escolhida para estabelecer um padrão de comparação com a quinidina. Os resultados obtidos com a 4-aminopiridina (53×10^{-6} M) foram similares aos observados com a quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M).

Em preparação curarizada nervo frênico diafragma de rato (d-tubocurarina $14,6 \times 10^{-6}$ M), a quinidina manteve sua capacidade de aumentar a amplitude das contrações, indicando que não atuou ao nível de receptores nicotínicos, uma vez que estão bloqueados pela d-tubocurarina.

A quinidina na preparação hemidiafragma cronicamente desnervada, induziu um aumento não significativo na amplitude das contrações musculares.

A cromakalina foi eficaz em antagonizar o efeito bloqueador da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) em músculo esquelético, reduzindo a amplitude das respostas musculares aumentadas pela quinidina.

Resultados similares aos observados com a quinidina foram obtidos quando a glibenclamida foi utilizada nas mesmas condições experimentais.

O fato da glibenclamida bloquear seletivamente canais de potássio dependentes de ATP, é sugestivo de que a ação da quinidina envolva canais desse tipo.

Por outro lado, a participação de canais de potássio ativados pelo cálcio nas ações da quinidina parece estar descartado, pois tanto a diminuição da concentração de cálcio da solução nutritiva como a utilização da nifedipina não modificaram o efeito facilitador da quinidina sobre as contrações musculares.

INTRODUÇÃO

A quinidina é um dextroisômero da quinina, descrita pela primeira vez por van HAYNINGER (1848) e preparada na forma atual por PASTEUR (1853). (apud BIGGER & HOFFMAN, 1990).

HARVEY (1939), estudou os efeitos da quinina sobre o músculo esquelético e na junção neuromuscular. Este autor observou que a quinina causava aumento da tensão das respostas provocadas por estímulos elétricos maximais tanto em preparações controles, como nas curarizadas ou desnervadas. Esta potenciação mecânica era acompanhada por um aumento na duração do potencial de ação. HARVEY (1939), observou ainda que a quinina induzia prolongamento para um segundo estímulo produzir uma resposta mecânica. De acordo com os resultados apresentados por HARVEY (1939), a placa motora tornava-se mais excitável na presença de quinina.

LAMMERS (1955) estudou a ação da quinina na fibra muscular, verificando que o estado ativo era prolongado. O mesmo efeito era obtido com a quinidina. LAMMERS (1955) demonstrou ainda que a quinina e quinidina aumentavam a tensão e o tempo de contração do músculo tibial anterior de gato e do músculo sartório de rã.

A quinidina é um potente antiarrítmico, que deprime a frequência do marcapasso e diminui a condução e a excitabilidade da fibra cardíaca (especialmente em tecido despolarizado).

Em grande parte, essas ações decorrem da capacidade da quinidina em bloquear os canais de sódio na sua forma ativada ou não ativada. A recuperação do bloqueio dos canais de sódio é menos completa no tecido despolarizado do que no totalmente polarizado. Assim, a quinidina alonga o período refratário e

deprime a excitabilidade e condução, no tecido despolarizado, mais do que no tecido normal

A quinidina também prolonga a duração do potencial de ação, o que se reflete no eletrocardiograma pelo alongamento do intervalo QT. O bloqueio dos canais de potássio com uma redução da corrente e do fluxo repolarizante é responsável por esse efeito. Deve ser observado que o alongamento da duração do potencial de ação reduz o tempo gasto em potenciais negativos de membrana, e portanto, aumenta a eficácia bloqueadora dos canais de sódio, da quinidina. Este alongamento da duração do potencial de ação e do período refratário efetivo reduz a frequência máxima da reentrada. A quinidina também tem propriedades antimalárica, antipirética e ocitócica. (HONDEGHEM & MASON, 1995)

A quinidina possui efeito potencializador sobre a ação de relaxantes musculares despolarizantes ou competitivos; esta ação foi descrita por SCHIMIDT (1963), MILLER *et al* (1967, 1968) e KATZUNG & WAY (1967).

Encontra-se na literatura médica (SCHIMIDT, 1963) a descrição de acidentes de recurarização no pós operatório imediato, em pacientes que haviam recebido relaxantes musculares durante o ato cirúrgico sob o tratamento com quinidina.

MILLER *et al* (1967), demonstraram, experimentalmente, que pequenas doses de quinidina são suficientes para potencializar a ação de relaxantes musculares competitivos e despolarizantes. Dessa forma estudaram a interação entre quinidina e agentes bloqueadores neuromusculares como a d-Tubocurarina (d-Tc), a Succinilcolina (Sch) e o decametônio (C₁₀), nas preparações frênico diafragma de rato e tibial anterior de gato. Verificaram

também a perda da eficiência do edrofônio em antagonizar o bloqueio neuromuscular causado pela galamina, após a adição de quinidina. No entanto estes autores não propuseram nenhuma explicação para estes achados.

MILLER *et al* (1968) observaram ainda aumento na amplitude das respostas musculares em preparação curarizada, o qual estava em associação com o uso de quinidina, sem contudo esclarecer o seu mecanismo.

Estudos com a quinidina foram realizados por BALZER (1972), o qual analisou a ação da quinidina sobre o sistema de transporte de cálcio em preparações isoladas de vesículas do retículo sarcoplasmático de músculo esquelético de coelho. BALZER (1972) propôs que a quinidina ligar-se-ia em ambos os sítios inespecíficos da fase proteica e lipídica da membrana. Propôs também uma inibição da captura do cálcio na membrana, produzido pela quinidina.

SENGES *et al* (1973) verificaram que a quinidina produz um efeito estabilizador do potencial de membrana, em fibras musculares do diafragma de ratos portadores de miotonia. Os autores verificaram ainda que a mesma tinha um efeito imediato sobre o potencial de ação, aumentando a sua duração e produzindo também aumento transitório na força de contração muscular, abolindo efeitos miotônicos.

COOK & HAYLETT (1984) pesquisaram o mecanismo de bloqueio induzido pela quinina e quinidina, de canais de potássio ativados pelo cálcio, em hepatócitos humanos e de cobaia. Observaram que tanto a quinina quanto a quinidina bloquearam canais de potássio voltagem dependente, de maneira semelhante.

FUJII *et al* (1990) estudaram os efeitos da cromakalina na presença de quinidina e drogas análogas, em músculo liso de bexiga urinária de cobaia. Os resultados destes experimentos sugeriram a presença de duas classes de canais, na membrana do músculo de bexiga urinária de cobaia, envolvidos na produção do potencial de ação: uma classe sendo responsável pela hiperpolarização e outra pela repolarização, ambas sendo bloqueadas pelo tetraetilamônio e quinidina.

A farmacologia dos canais de potássio é de considerável interesse (veja revisão de COOK & QUAST, 1990) devido a presença destes canais em diversos tipos de tecidos. A excitabilidade elétrica das membranas, dos nervos e das células musculares que geram e propagam o potencial de ação, é essencial para a comunicação no sistema nervoso e na atividade mecânica dos músculos cardíacos e estriados.

A excitabilidade elétrica depende da existência das comportas dependentes de voltagem dos canais iônicos na membrana celular: sódio, potássio e cálcio. Estes canais são estruturas proteicas e eles todos possuem basicamente o mesmo funcionamento.

Os canais de potássio têm papel fundamental no controle da excitabilidade da membrana celular. Diversos tipos de canais de potássio, foram descritos como por exemplo: dependentes de voltagem (ADAMS & NONNER, 1990), dependentes de cálcio (HAYLETT & JENKINSON, 1990), e dependentes de ATP (ASHFORD, 1990).

Os canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}), estão presentes em células pancreáticas, têm papel importante no controle de secreção de insulina. Estes canais também se fazem

presentes em tecido cardíaco, em músculo esquelético e músculo liso vascular e não vascular (COOK & HALES, 1984).

O uso de ativadores dos canais de potássio (cromakalina, pinacidil e RP 52891) e de seus antagonistas (glibenciamida, fentolamina e alinidina) tem contribuído para o estudo do papel dos canais de potássio em músculo liso, esquelético e cardíaco, assim como para o estudo da função neural e endócrina de certos órgãos. (McPHERSON 1993)

Algumas destas drogas, como a cromakalina, causa relaxamento do músculo liso, devido ao aumento da condutância ao potássio, causando hiperpolarização e inibindo a propagação do potencial de ação sucessivo. Inicialmente através de técnicas eletrofisiológicas e usando-se "patch-clamp" ficou comprovado o mecanismo de ação da cromakalina, isto é, atua ativando canais de potássio e conseqüentemente causa hiperpolarização. Usando-se a técnica de "patch-clamp" foi possível identificar um tipo específico de canal de potássio de alta condutância. Esta descoberta coincide com estudos que demonstram a existência de canais de potássio dependentes de ATP em vários tipos de tecidos (cardíaco, liso, esquelético), que causam despolarização.

A cromakalina tem sido utilizada como droga vasodilatadora, sendo eficaz nas isquemias, na hipertensão e também na asma.

Embora a ação farmacológica da cromakalina tem sido descrita em músculo liso (FUJII *et al* 1990), músculo cardíaco (NOMA, *et al* 1993), musculatura vascular (WILSON, *et al* 1989), (BUCKINGHAN *et al* 1989; LONGMORE *et al* 1990), em músculo esquelético, os seus efeitos foram pouco estudados.

2 - OBJETIVOS

O envolvimento da quinidina no aumento das contrações em preparações de músculo esquelético tem interesse, principalmente com relação ao seu mecanismo de ação ao nível de canais iônicos da membrana celular. Para tanto, foram realizados experimentos com drogas bloqueadoras e ativadoras desses canais.

Desta forma, o principal objetivo da presente pesquisa foi estudar os mecanismos envolvidos no aumento da amplitude das respostas musculares induzidos pela quinidina.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo dos possíveis mecanismos envolvidos no aumento da amplitude das respostas musculares induzido pela quinidina, foi realizado usando-se preparações nervo frênico-diafragma e hemidiafragma cronicamente desnervado de rato.

No primeiro caso verificou-se o aumento na amplitude das respostas musculares em presença de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), em preparações curarizadas (d-Tc: $14,6 \times 10^{-6}$ M) ou não, sob estimulação elétrica do nervo ou do músculo. Utilizou-se solução nutritiva de Tyrode com a concentração de cálcio alterada de 1,80 mM para 0,90 mM ou 0,45 mM. Alguns experimentos foram realizados com a nifedipina (2×10^{-5} M), 4-aminopiridina (53×10^{-6} M), cromakalina (1×10^{-4} M). Pesquisou-se também o efeito da quinidina sobre potenciais bioelétricos do músculo (potencial de membrana, potencial de placa terminal em miniatura e potencial de ação).

Na preparação hemidiafragma cronicamente desnervada, além do efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), estudou-se também o efeito da 4-aminopiridina (53×10^{-6} M).

A determinação da significância da diferença entre as médias foi feita usando-se a análise de variância, com nível de significância de 1%, seguido do teste de Dunnett, de comparações múltiplas.

3.1- PREPARAÇÃO NERVO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE RATO

Foram utilizados ratos Wistar de 180g a 200g de peso. Após anestesia dos animais pelo hidrato de cloral (240 mg/Kg por via intraperitoneal) e sangria por secção dos vasos do pescoço, procedeu-se a retirada e montagem do segmento do hemidiafragma esquerdo com uma porção do frênico correspondente, de acordo com a técnica de BÜLBRING (1946).

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) e o vértice correspondente à sua porção tendinosa, foi fixado a um fio o qual foi ligado a uma alavanca cardíaca de Starling que através de uma pena inscritora, registrava as contrações do diafragma no papel esfumado do tambor em quimógrafo; ou em fisiógrafo Narco-Bio System tipo Narco trace 40 acoplado a um Universal Coupler tipo 7159, cuja tensão dada foi de 2,5g/cm, através de um transdutor Miograph F60. O volume do banho foi de 30 ml e sua temperatura mantida a 37°C Oxigenou-se a preparação pelo borbulhamento de carbogênio (95% O₂ +5% CO₂) no banho. Como solução nutritiva usou-se a de Tyrode com as seguintes concentrações em mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; NaHCO₃ 11,9 mg; MgCl₂ 0,25; NaHPO₄ 0,3; e glicose 11,0 (em algumas experiências a concentração do cálcio foi alterada).

Quando estimulou-se indiretamente o diafragma, utilizou-se pulsos retangulares maximais, frequência de 0,1 Hz e duração de 0,2 msec. Os estímulos foram fornecidos por um estimulador GRASS S 88.

Em todos os experimentos utilizou-se o seguinte protocolo: estimulação do nervo frênico por quinze minutos, à seguir adição da quinidina. O tempo de observação dos efeitos produzidos pela quinidina foi de trinta minutos.

Foram realizados experimentos nos quais o teor de cálcio da solução nutriente foi reduzido de 1,80 mM para 0,90 mM e 0,45 mM. Em alguns destes experimentos utilizou-se a quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sendo que outros experimentos foram realizados na ausência da mesma.

Seguindo a mesma metodologia, foram realizados experimentos com a 4-aminopiridina, em preparação frênico-diafragma de rato.

Em preparações curarizadas (d-Tc: $14,6 \times 10^{-6}$ M) foram realizados experimentos adicionando-se a quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) e seus efeitos observados durante trinta minutos.

Seguindo o mesmo protocolo, em preparação frênico-diafragma de rato curarizado (d-Tc: $14,6 \times 10^{-6}$ M) adicionou-se a 4-aminopiridina (53×10^{-6} M).

Experimentos foram realizados adicionando-se a quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) durante trinta minutos e na vigência do seu efeito máximo adicionando-se a 4-aminopiridina (53×10^{-6} M). Experimentos foram também realizados alterando-se a ordem da adição das drogas.

Incubou-se a preparação frênico-diafragma de rato com nifedipina (2×10^{-5} M). A nifedipina foi diluída em 1ml de etanol e adicionada na solução nutritiva; após trinta minutos adicionou-se quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M).

Seguindo-se o mesmo protocolo, em preparação incubada com a nifedipina, adicionou-se a 4-aminopiridina (53×10^{-6} M).

Os experimentos com a nifedipina foram realizados com pouca luminosidade, uma vez que a nifedipina é fotossensível. Experimentos controles foram realizados com a finalidade de demonstrar que o solvente utilizado para dissolver a nifedipina não alterava as respostas musculares sob estímulos indiretos.

Foram realizados experimentos com a cromakalina (1×10^{-4} M). A cromakalina era adicionada em preparações, as quais haviam recebido adição prévia de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M). Nesses experimentos adotou-se o seguinte protocolo: após adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), decorridos trinta minutos na vigência do seu efeito sobre a amplitude das contrações, adicionou-se a cromakalina, 1×10^{-4} M.

Os experimentos realizados com a cromakalina e glibenclamida obedeceram o seguinte protocolo:

Primeiramente foi feito um registro controle durante 15 minutos; após este controle sob estimulação elétrica indireta, a glibenclamida (1×10^{-5} M) foi adicionada na preparação e seus efeitos foram observados por 90 minutos. Decorrido esse tempo, a cromakalina (1×10^{-4} M) foi adicionada e seus efeitos observados durante 60 minutos.

3.2 - PREPARAÇÃO HEMIDIAFRAGMA CRONICAMENTE DESNERVADO DE RATO

Ratos Wistar de 180 a 200g foram desnervados segundo a técnica descrita por Vital Brazil (1965).

Esta consiste na secção do nervo frênico esquerdo. Para proceder-se a desnervação colocou-se o animal anestesiado pelo éter etílico, em decúbito lateral direito praticando-se uma incisão de um centímetro perpendicular à linha mediana do terço inferior da região lateral do tórax esquerdo

A incisão compreendia a pele e a camada muscular delgada que recobre esta região. Ao longo de um espaço intercostal com extensão de aproximadamente 1,5 centímetros, cortou-se os músculos intercostais e com bastão de vidro com extremidade recurvada, prendeu-se o frênico que, tracionando-se as bordas da incisão foi seccionado.

Em seguida, suturou-se somente a pele, por meio de um ponto. Decorridos 15-20 dias retirou-se o segmento em forma de leque do hemidiafragma esquerdo e montou-se a preparação, como no item 3.1.

A solução nutritiva, o volume e a temperatura a qual foi mantida a preparação, assim como o processo de registro das contrações foram iguais aos da preparação frênico diafragma de rato. Os estímulos com pulsos retangulares de 2 milissegundos de duração, 0,1 Hertz de freqüência e voltagem maximal foram fornecidos por estimulador eletrônico Grass S 88.

Nas preparações desnervadas adicionou-se acetilcolina ($14,6 \times 10^{-6}$ M), registrando-se a contratatura. Após a adição de acetilcolina lavou-se a preparação por cinco vezes e adicionou-se as seguintes drogas:

quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

4-aminopiridina (53×10^{-6} M)

A adição de acetilcolina foi a maneira mais viável de confirmar a desnervação da preparação.

3.3 - ESTUDO DO POTENCIAL DE REPOUSO, POTENCIAL DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA E POTENCIAL DE AÇÃO

Utilizou-se ratos Wistar de 180 a 200g de peso, cujo hemidiafragma esquerdo foi retirado com um segmento do frênico correspondente, segundo a técnica descrita por BÜLBRING (1946).

Estendeu-se o músculo e fixou-se com alfinetes apropriados com sua face torácica voltada para cima no fundo de uma cuba de perspex com 10 centímetros de comprimento, 5 centímetros de largura e 2 centímetros de profundidade.

A cuba foi preenchida com 30 ml de solução de TYRODE sendo a oxigenação da preparação feita pelo borbulhamento com carbogênio. Manteve-se a preparação na temperatura de 37°C.

Os potenciais foram captados através de microeletrodos (Me) de vidro preenchidos com solução de KCl 3M. Os Me apresentavam resistência compreendida entre 5 a 20 MΩ. Foram preparados no próprio laboratório e conservados em geladeira. Para sua confecção utilizaram-se tubos de vidro apropriados (capilares de vidro CLARK que continham microcapilar interno para facilitar o preenchimento com KCl) e um estirador de microeletrodo "Microelectrode Puller", Modelo 8104, Palmer.

3.3.1 - DESCRIÇÃO SUMÁRIA DA APARELHAGEM ELETROFISIOLÓGICA

O Microeletrodo entrava em contato com o suporte por sua extremidade posterior com o filamento em espiral de prata cloretada, contendo no interior de pequeno tubo de vidro (2 centímetros de comprimento) preenchido com ágar. Encaixava-se o microeletrodo em uma das extremidades desse tubo, saindo pela outra, um fio condutor que unia o filamento de prata a um seguidor catódico.

O pequeno tubo que era sustentado pelo braço de um micromanipulador JENA acoplado a um microscópio estereoscópico Zeiss para aumento de até 40 vezes. Este equipamento permitia realizar pequenos deslocamentos verticais e horizontais, controlando o microeletrodo. O seguidor catódico estava posicionado próximo ao braço do micromanipulador e conectava-se ao canal do osciloscópio TEKTRONIX 5.103 N com módulos 5A 22N "DIFFERENTIAL AMPL" e 5B 12N: " DUAL TIME BASE". O eletrodo indiferente, constituído por um fio espiralado de prata cloretada contido em tubo de vidro curvo preenchido com ágar-salina, mantinha-se mergulhado na solução nutritiva. Estava ligado por meio de um fio condutor a um gerador de impulsos capaz de fornecer sinais de 100, 20, 5, 1 e 0,2 mV. A preparação e toda a aparelhagem empregada permaneciam no interior de uma gaiola de FARADAY montada sobre uma mesa rígida, fixada no solo a fim de evitar vibrações. A aparelhagem está descrita na figura a seguir. (Figura 1)

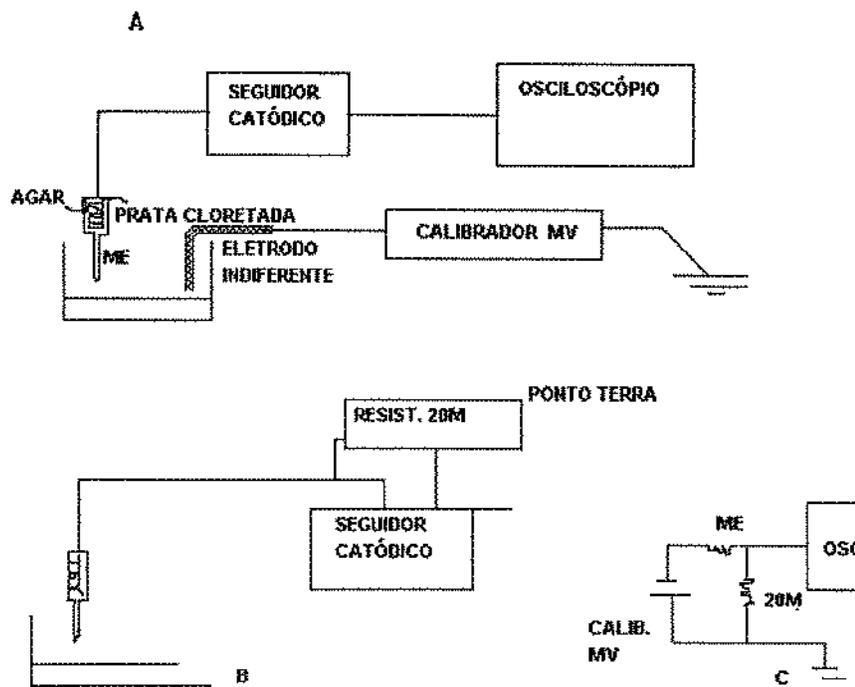


Figura 1 - Esquema do circuito para registro eletrofisiológico dos potenciais bioelétricos.

A - esquema simplificado

B - esquema simplificado para obtenção de resistência do Me

C - circuito para medida da resistência do Me

3.3.2 - PROCEDIMENTOS

Após ser retirado do seu suporte de estocagem, o Me era encaixado no suporte. Fixava-se o conjunto no braço do micromanipulador, ligando-se o fio condutor ao seguidor catódico.

Procedia -se à medida da resistência do Me mergulhando-o na solução nutritiva e introduzindo em paralelo no circuito uma resistência de valor conhecido ($20\text{ M}\Omega$). Eram desprezados aqueles Me cuja resistência não estava compreendida entre 5 e $20\text{ M}\Omega$.

A medida do potencial de membrana (potencial de repouso) das fibras musculares se fez da seguinte forma: sob o controle de microscópio inseria-se o microeletrodo no interior de uma fibra muscular e media-se o deslocamento vertical sofrido pelo feixe no osciloscópio, no momento da penetração. Repetia-se o mesmo procedimento em cinco fibras distintas em período não superior a um minuto, calculando-se a média aritmética das leituras realizadas. Determinou-se o potencial de repouso multiplicando-se o valor da média por um fator de correção (fc). Este era estabelecido introduzindo-se no circuito um sinal de 100mV e medindo-se a deflexão correspondente no osciloscópio (fc=100/deflexão correspondente).

3.3.3 - REGISTRO DO POTENCIAL DE MEMBRANA

Nas experiências realizadas para avaliar o efeito da quinidina sobre o potencial de membrana, esta foi utilizada na concentração de $1,87 \times 10^{-6}$ M. A determinação do potencial de membrana foi feita em regiões distintas da fibra muscular.

Após a determinação da medida do potencial de membrana controle adicionou-se quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) ao banho e procediam-se as leituras aos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos, na região das placas motoras em cinco diferentes locais da fibra.

3.3.4 - REGISTRO DO POTENCIAL DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA

Os potenciais de placa terminal em miniatura foram captados através da inserção do microeletrodo nas fibras musculares na região da placa motora e registrados através do osciloscópio (sensibilidade 0,5-1,0 mV/cm). Nestes experimentos em que se estudou o efeito da quinidina sobre a frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura, utilizou-se a quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M).

Os potenciais de placa terminal em miniatura foram fotografados com filme "Polaroid" por meio de uma câmara de osciloscópio modelo C-5A. Os parâmetros controles foram definidos antes da adição da droga.

Os potenciais de placa terminal em miniatura foram registrados aos 5, 15 e 30 minutos após a adição da quinidina

3.3.5 - REGISTRO DO POTENCIAL DE AÇÃO

As condições experimentais na avaliação dos efeitos da quinidina sobre o potencial de ação foram semelhantes às anteriores.

Através de estimulador GRASS S88 e de unidade isoladora de estímulos GRASS modelo S.1.U.5. estimulou-se indiretamente a preparação com pulsos máximos de 0,5-1,0 volts e 0,2 msec de duração e frequência de 0,1 Hz. Os potenciais de ação foram registrados através de osciloscópio (sensibilidade 20 mV/cm) e fotografados de maneira idêntica à dos potenciais de placa terminal em miniatura.

O microeletrodo foi inserido nas fibras musculares (região das terminações nervosas). Foi fotografado o potencial de ação controle e em seguida adicionou-se quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M). Os potenciais foram fotografados aos quinze e trinta minutos de observação.

3.4 - DROGAS UTILIZADAS:

Ach: Acetilcolina - Sigma Chemical - E.U.A.

4-AP: 4-aminopiridina, Sigma Chemical Company - E.U.A.

Bicarbonato de sódio: Carlo Erba - Itália

Cloreto de cálcio: Merck do Brasil

Cloreto de magnésio: Merck do Brasil.

Cloreto de potássio: Merck do Brasil

Cloreto de sódio: Merck do Brasil

Cromakalim: Cromakalina, Sigma Chemical Company - E.U.A.

dTC: d-Tubocurarina, ABBOT - Laboratórios do Brasil, Ltda.

Fabrik - Busch-S.G.

Glibenclamide: glibenclamida, Sigma Chemical Company - E.U.A.

Glicose: Merck do Brasil

Hidrato de cloral: Pentofarma Ltda, Brasil

Nifedipine: nifedipina -Sigma Chemical Company - E.U.A.

Quinidina: Sulfato de quinidina, laboratório: Chemische-Alemanha

4-RESULTADOS:

4.1 - ESTUDO MIOGRÁFICO PREPARAÇÃO FRÊNICO-DIAFRAGMA DE RATO

Em preparações sob estimulação elétrica indireta a adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) induziu aumento da amplitude das contrações musculares. Este aumento atingiu seu valor máximo aos trinta minutos, tempo fixado para a observação dos efeitos da droga em estudo. (Tabela1).

O aumento da amplitude das contrações à estimulação elétrica indireta foi de $52,4 \pm 3,5\%$, (Figura 2). Assim empregando-se doses crescentes, verificou-se aumento dependente da dose (Figura 3). Esse mesmo efeito pode ser observado na forma de gráfico (Figura 4).

O efeito do cálcio sobre o aumento da amplitude das contrações musculares, induzido pela quinidina, também foi avaliado na preparação frênico-diafragma de rato. Diminuindo-se o teor de cálcio da solução nutritiva de 1,8 mM para 0,9 mM e 0,45 mM, observou-se que somente esta última concentração não manteve a amplitude das respostas contráteis (Figuras 5 e 6)

A quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) na preparação submetida a estimulação elétrica indireta e em uma solução nutritiva com teor de cálcio alterado para 0,90 mM induziu aumento na amplitude das contrações (Figura 7). Porém este aumento foi menor em relação aos experimentos realizados com solução nutritiva de Tyrode com teor de cálcio normal $29,2 \pm 3,5\%$. Experimentos foram também realizados utilizando solução nutritiva com Ca^{2+} 0,45 mM, tendo a quinidina induzido aumento na amplitude das contrações de $26,6 \pm 3,2\%$ (Figura 8).

TABELA 1 - Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) sobre as contrações musculares na preparação nervo frênico-diafragma de rato.

EXPERIMENTO	CONTROLE	15' após QUINIDINA	30' após QUINIDINA
1	11	15	18
2	10	12	19
3	18	23	26
4	15	19	23
5	16	22	24
média± e.padrão	14±1,69	18±2,23	22,2±1,78
percentagem de aumento		28,87	58,57

Obs: 1-Os valores apresentados correspondem a contrações musculares indiretas, em milímetros

2-A análise estatística indicou que as médias obtidas na presença de quinidina diferiram, de maneira significativa, tanto do controle como entre sí.

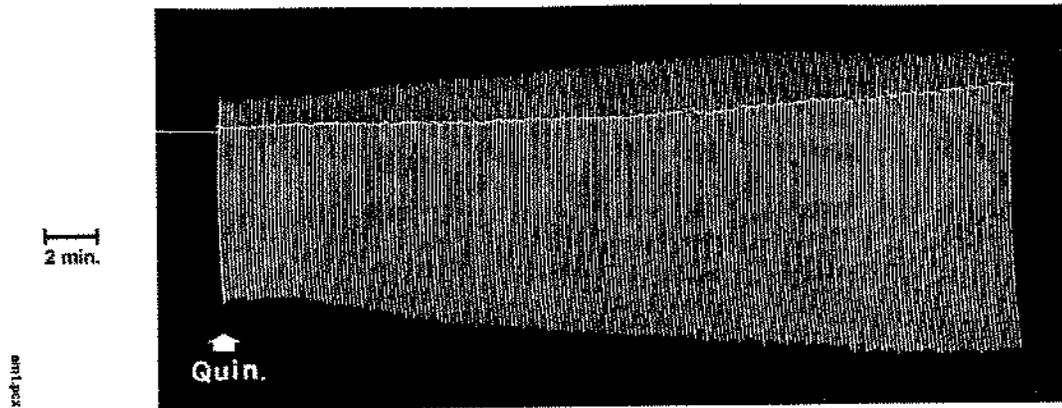


Figura 2 - Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) no registro miográfico da preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta. Na seta (QUIN.) a quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) foi adicionada.

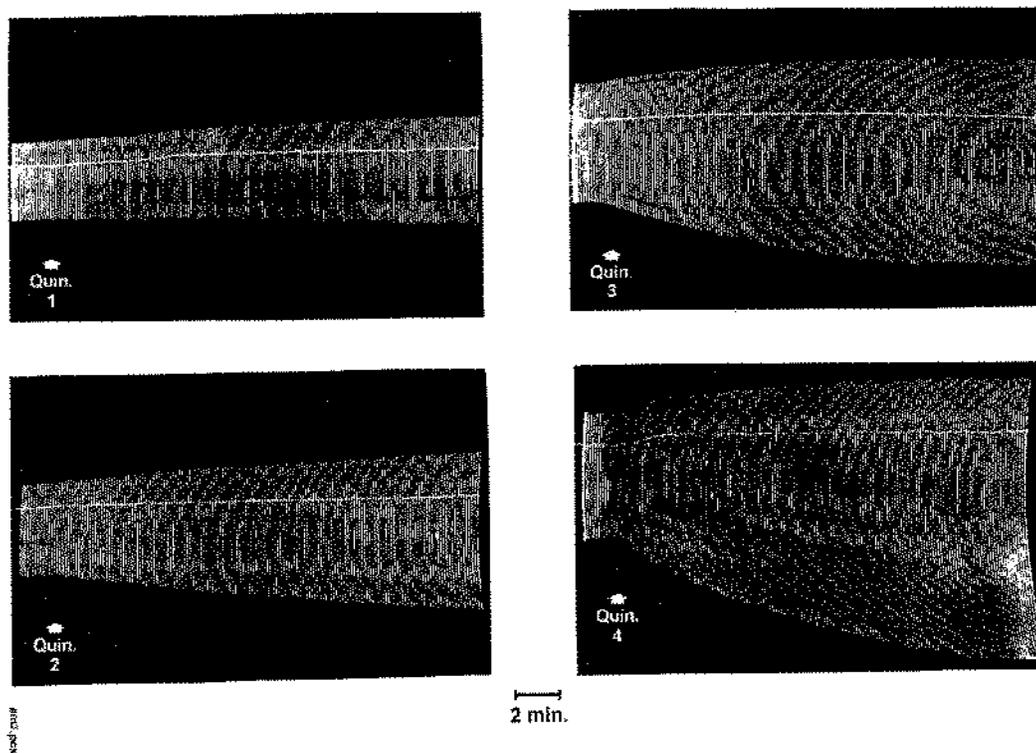


FIGURA 3 - Efeito da quinidina em doses crescentes sobre a resposta contrátil à estimulação elétrica indireta da preparação nervo frênico-diafragma de rato.

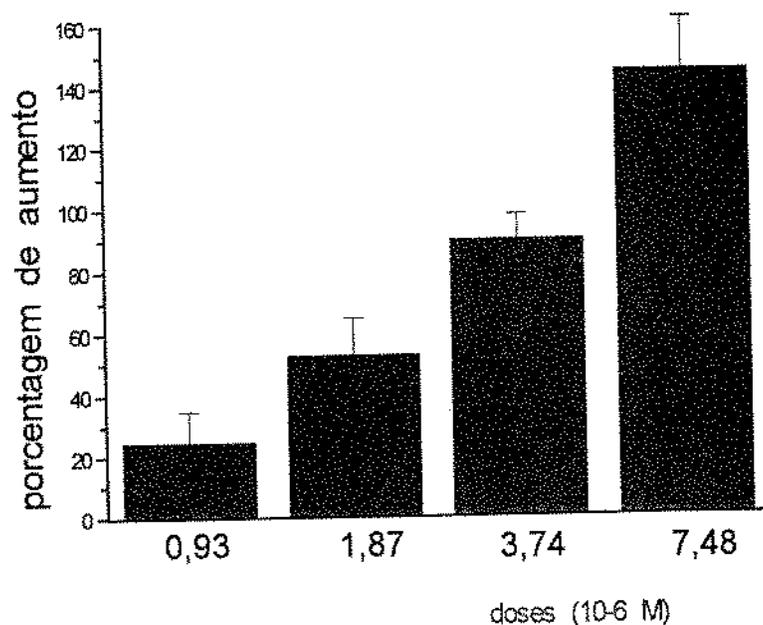


Figura 4 - Efeito da quinidina sobre a amplitude das contrações musculares da preparação frênico-diafragma de rato, nas diferentes doses.

- 1- Os valores apresentados correspondem a contrações musculares indiretas, em milímetros.
- 2- Os valores de cada coluna representam a média \pm e. padrão da amplitude das contrações.
- 3- A análise estatística indicou que as médias obtidas na presença de quinidina nas doses assinaladas acima, diferiram de maneira significativa, entre si.

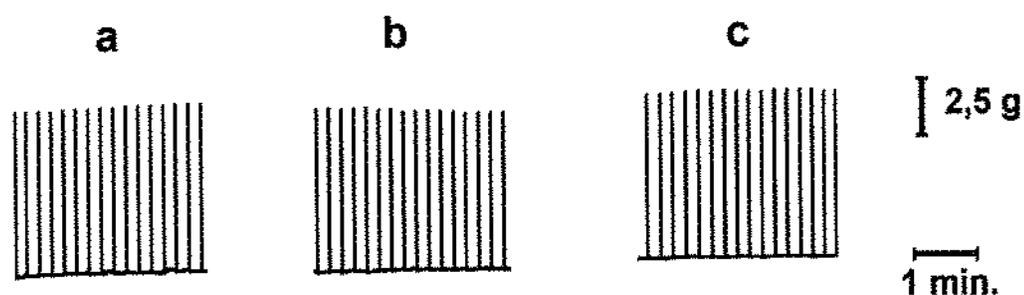


Figura 5 - Efeito da diminuição do cálcio da solução nutritiva para 0,90 mM sobre as respostas musculares da preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.

A- Registro controle em solução nutritiva com 1,80 mM de Ca^{+2}

B- 15 minutos após introdução da solução nutritiva com 0,90 mM de Ca^{2+}

C- 30 minutos após introdução da solução nutritiva com 0,90 mM de Ca^{2+}

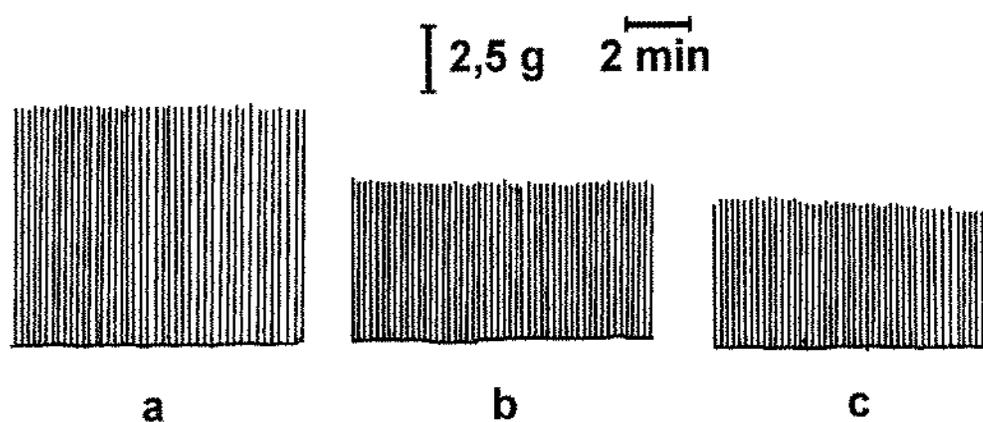


Figura 6 - Efeito da diminuição do cálcio da solução nutritiva para 0,45 mM sobre as respostas musculares da preparação nervo frênico-diafragma de rato, sob estimulação elétrica indireta.

A- Registro controle em solução nutritiva com 1,80 mM de Ca^{2+}

B- 15 minutos após introdução da solução nutritiva com 0,45 mM de Ca^{2+}

C- 30 minutos após introdução da solução nutritiva com 0,45 mM de Ca^{2+}

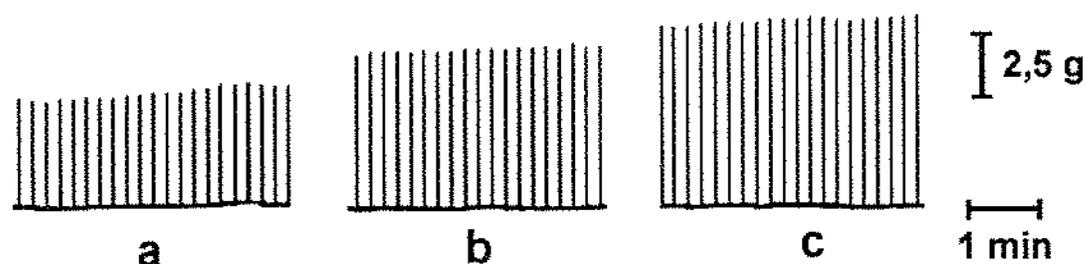


FIGURA 7 - Efeito da diminuição do cálcio da solução nutritiva para 0,90 mM sobre o aumento das respostas musculares da preparação nervo frênico-diafragma de rato em presença de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sob estimulação elétrica indireta.

A- Registro controle, em solução nutritiva com cálcio 0,90 mM

B- 15 minutos após adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

C- 30 minutos após adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

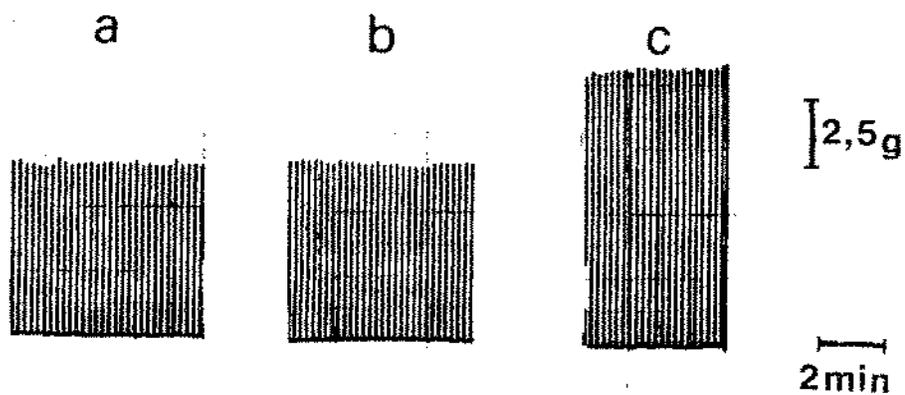


Figura 8 - Efeito da diminuição do cálcio da solução nutritiva para 0,45 mM, sobre as respostas musculares da preparações frênico-diafragma de rato em presença de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M), sob estimulação elétrica indireta.

A- Registro controle, em solução nutritiva com cálcio 0,45 mM

B-15 minutos após adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

C-30 minutos após adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

A fim de investigar mais profundamente os mecanismos de ação da quinidina, estudou-se a sua interação com diferentes compostos como: 4-aminopiridina, nifedipina e cromakalina.

Para analisarmos a interação: quinidina e 4-aminopiridina realizaram-se ensaios alternando a ordem das drogas, de maneira aleatória. Iniciou-se então, experimentos com a adição prévia de 4-aminopiridina (53×10^{-6} M). Após 30 minutos, foi adicionada a quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M).

O resultado desta série de experimentos foi: aumento em torno de $78 \pm 6,6\%$ ao final de uma hora (Tabela 2).

Experimentos similares foram realizados, com a inversão da ordem das drogas citadas. O resultado do efeito causado pela adição das drogas foi aumento de $75,24 \pm 3,77\%$ ao final de uma hora.

Preparações foram incubadas com nifedipina (2×10^{-5} M), e à seguir adicionou-se quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) (Tabela 3).

Em preparações curarizadas (d-Tc: $14,6 \times 10^{-6}$ M) o aumento da amplitude das contrações pela quinidina foi menor que nas preparações não curarizadas, $20,78 \pm 5,06\%$ (n=5) (Figura 9). Nestas preparações o aumento também foi dependente da dose (Figura 11).

Com a 4-aminopiridina o aumento observado em preparações curarizadas foi de $24,58 \pm 9,02\%$ (n=5) (Figura 10).

Experimentos com a cromakalina foram realizados. O objetivo foi averiguar se havia algum envolvimento da quinidina com canais de potássio, uma vez que a cromakalina age ativando estes canais (Fujii *et al* 1990).

A cromakalina (1×10^{-4} M) foi utilizada após 30 minutos da adição prévia de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) (Figura 12).

Nestes experimentos a cromakalina reduziu a amplitude das contrações de aproximadamente 60% quando comparado ao aumento induzido pela quinidina (Tabela 4).

TABELA 2 - Efeitos da 4-aminopiridina (53×10^{-6} M) e da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) na preparação nervo frênico-diafragma de rato.

Experimento	controle	15 minutos após 4AP	30 minutos após 4AP	15 minutos após quinidina	30 minutos após quinidina
1	25	34	52	63	63
2	27	47	57	72	83
3	31	42	50	70	90
4	41	51	62	74	75
Média+e. padrão	31,0 \pm 4,1	43,5 \pm 4,22	52,2 \pm 3,10	69,7 \pm 2,76	78 \pm 6,65
Porcentagem de aumento	—	+40,30	+78	+124,8	+151,6

Obs:

1- Os valores apresentados correspondem a contrações musculares indiretas, em milímetros.

2- A análise estatística indicou que as médias obtidas na presença de 4-aminopiridina e quinidina diferiram, de maneira significativa, tanto do controle como entre si.

TABELA 3- Efeitos da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) na preparação nervo frênico diafragma de rato em presença de nifedipina (2×10^{-5} M).

experimento	controle (nifedipina)	adição de quinidina	30 minutos após quinidina
1	28	31	35
2	33	36	38
3	37	40	42
4	32	36	39
5	30	32	36
média \pm e. padrão	32 \pm 1,7	35 \pm 1,8	38 \pm 1,36
Percentagem de aumento	—	9,37%	18,75%

Obs:

1- Os valores apresentados correspondem a contrações musculares indiretas, em milímetros.

2- A análise estatística indicou que as médias obtidas na presença de nifedipina e quinidina diferiram, de maneira significativa, do controle para tratado.

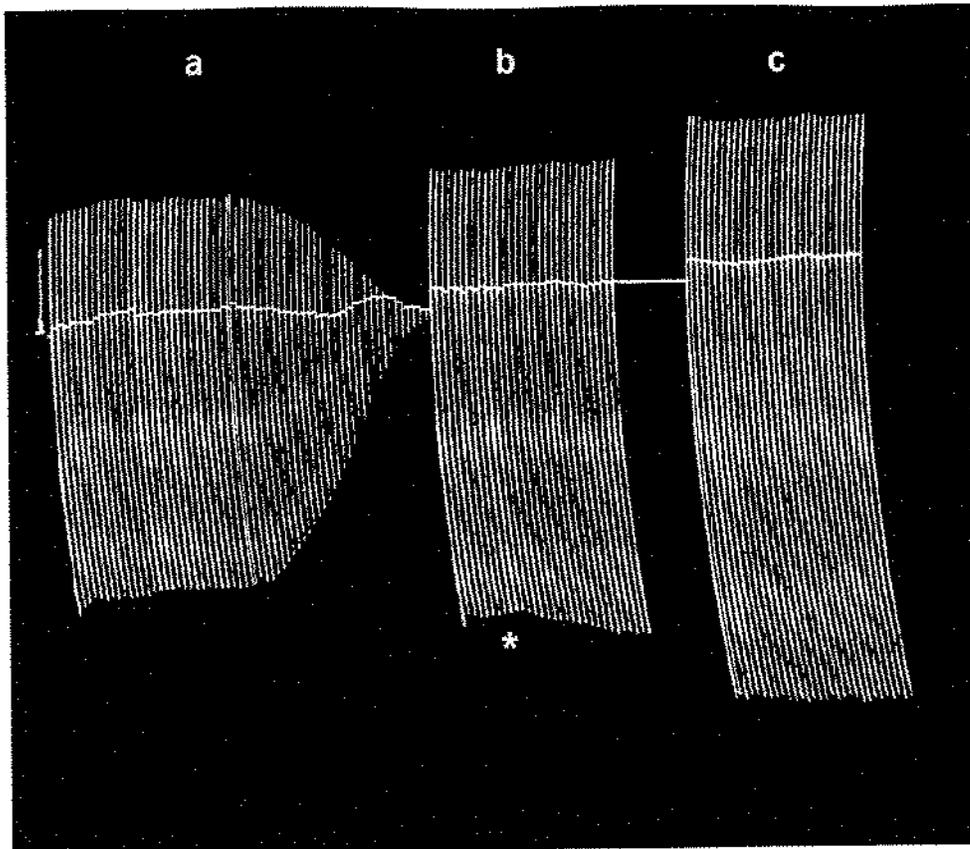


Figura 9 - Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) nas respostas musculares da preparação nervo frênico-diafragma de rato curarizada (d-Tc: $14,6 \times 10^{-6}$ M), sob estimulação elétrica direta.

A- Estímulos elétricos indiretos e adição de d-Tc ($14,6 \times 10^{-6}$ M).

B- estímulos elétricos diretos e * adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

C- 30 minutos após adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

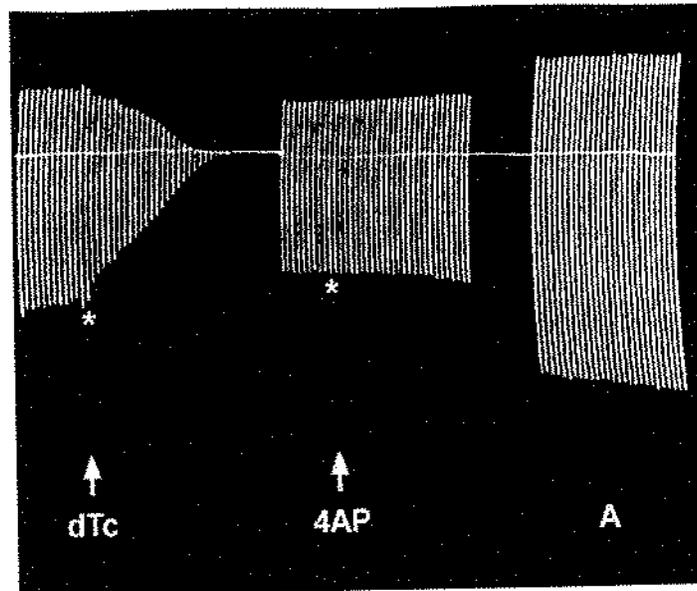


FIGURA 10 -Efeito da 4-aminopiridina (4-AP : 53×10^{-6} M) sobre as respostas musculares da preparação nervo frênico-diafragma de rato curarizado (d-Tc : $14,6 \times 10^{-6}$ M), sob estimulação elétrica direta.

Estímulos elétricos indiretos e * adição de d-Tc ($14,6 \times 10^{-6}$ M)

estímulos elétricos diretos e * adição de 4-aminopiridina (53×10^{-6} M)

A- 30 minutos após adição de 4-aminopiridina (53×10^{-6} M)

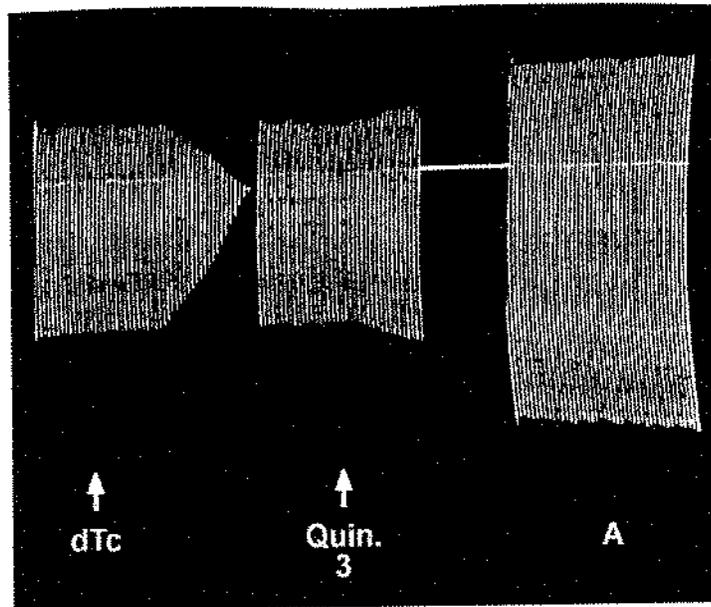


Figura 11 - Efeito da quinidina ($3,74 \times 10^{-6}$ M) sobre as respostas musculares da preparação nervo frênico-diafragma de rato curarizado, (d-Tc: $14,6 \times 10^{-6}$ M).

Estímulos elétricos indiretos e adição de d-Tc ($14,6 \times 10^{-6}$ M)
estímulos elétricos diretos e adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

A-30 minutos após adição de quinidina ($3,74 \times 10^{-6}$ M)

Nos experimentos realizados com glibenclamida (1×10^{-5} M) observamos aumento da amplitude das contrações musculares, sendo que seus efeitos foram observados durante 90 minutos. Decorrido esse tempo, adicionou-se a cromakalina (1×10^{-4} M). O tempo de observação foi de 60 minutos, ocorrendo um antagonismo por parte da cromakalina (Figura 13).

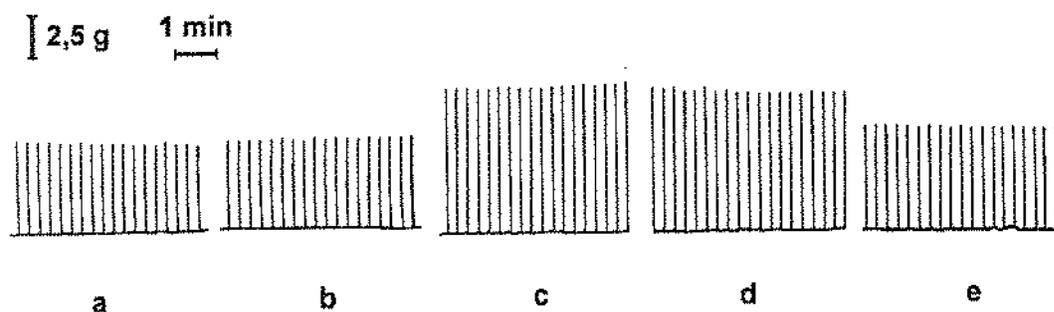


Figura 12 - Efeito da cromakalina (1×10^{-4} M) na preparação nervo frênico-diafragma de rato, em presença de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M).

a-controle

b-adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

c-30 minutos após adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

d-adição de cromakalina (1×10^{-4} M)

e-30 minutos após adição de cromakalina (1×10^{-4} M)

TABELA 4 - Efeito da quinidina e cromakalina sobre a amplitude das contrações na preparação nervo frênico diafragma de rato

EXPERIMENTO	CONTROLE	30' após QUIN	30' após CROM
1	21	38	20
2	22	45	30
3	25	54	34
4	30	47	38
Média + e. padrão	24,5+2,33	46±3,80	30,5±4,45
percentagem de aumento	—	+87,7%	+24,5%

Obs:

1- Os valores apresentados correspondem a contrações musculares indiretas, em milímetros.

2- A análise estatística indicou que as médias obtidas na presença de quinidina e cromakalina diferiram, de maneira significativa, tanto do controle como entre si.

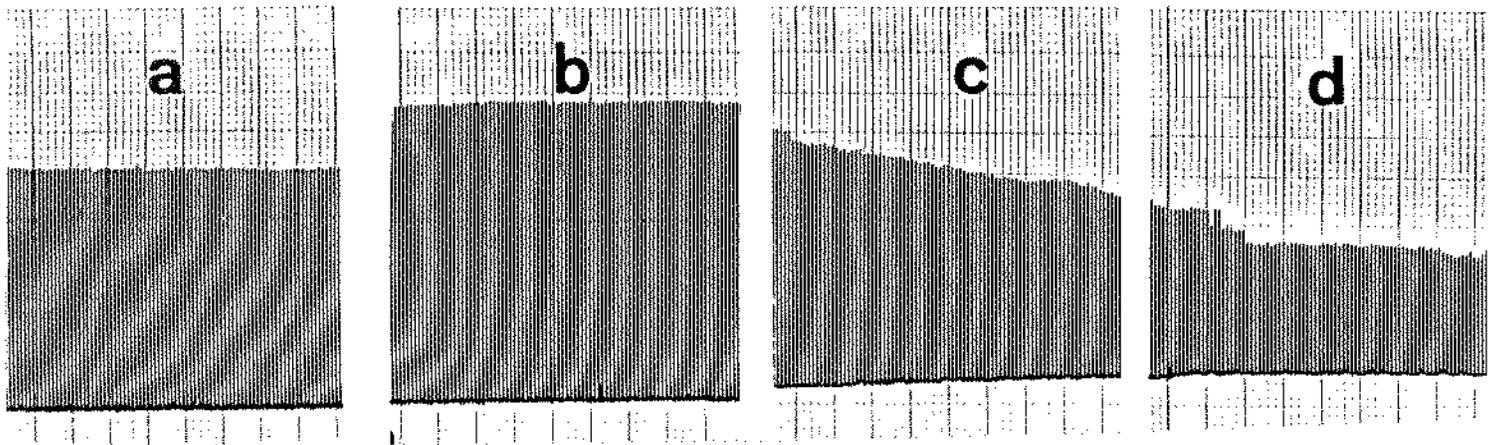


Figura 13 - Efeito da cromakalina (1×10^{-4} M), na preparação nervo frênico-diafragma de rato, em presença de glibenclamida (1×10^{-5} M).

a-controle

b-45 minutos após adição de glibenclamida

c-10 minutos após adição de cromakalina

d-60 minutos após adição de cromakalina

4.2 - PREPARAÇÃO HEMIDIAFRAGMA CRONICAMENTE DESNERVADO DE RATO

A desnervação foi levada a efeito segundo Vital Brazil (1965), descrita no item Materiais e Métodos.

A preparação hemidiafragma cronicamente desnervada de rato foi submetida ao teste inicial com acetilcolina (a adição de acetilcolina é a maneira mais viável para confirmar a desnervação) e a seguir procedeu-se a lavagem com TYRODE.

Tais preparações foram tratadas, a seguir, com as seguintes drogas: quinidina ($1,87 \times 10^{-6} \text{ M}$) e 4-aminopiridina ($53 \times 10^{-6} \text{ M}$).

Submetida a estímulos elétricos diretos (voltagem maximal, frequência 0,1 Hz, duração 2,0 msec) a preparação recebeu $1,87 \times 10^{-6} \text{ M}$ de quinidina. Observando-se por um período de 30 minutos, verificou-se pequeno aumento na amplitude das respostas musculares $11 \pm 3,46\%$ (n=5) (Figura 14). Este discreto aumento observado não é dependente da dose $13,4 \pm 3,48\%$ (n=5) (Figura 15).

Prosseguindo os experimentos com a preparação desnervada, seguindo o mesmo procedimento em relação à acetilcolina, adicionou-se a 4-aminopiridina ($53 \times 10^{-6} \text{ M}$). Após 30 minutos de observação, o resultado foi um discreto, aumento na amplitude das respostas musculares $12,4 \pm 4,52\%$ (n=5) (Figura 16).

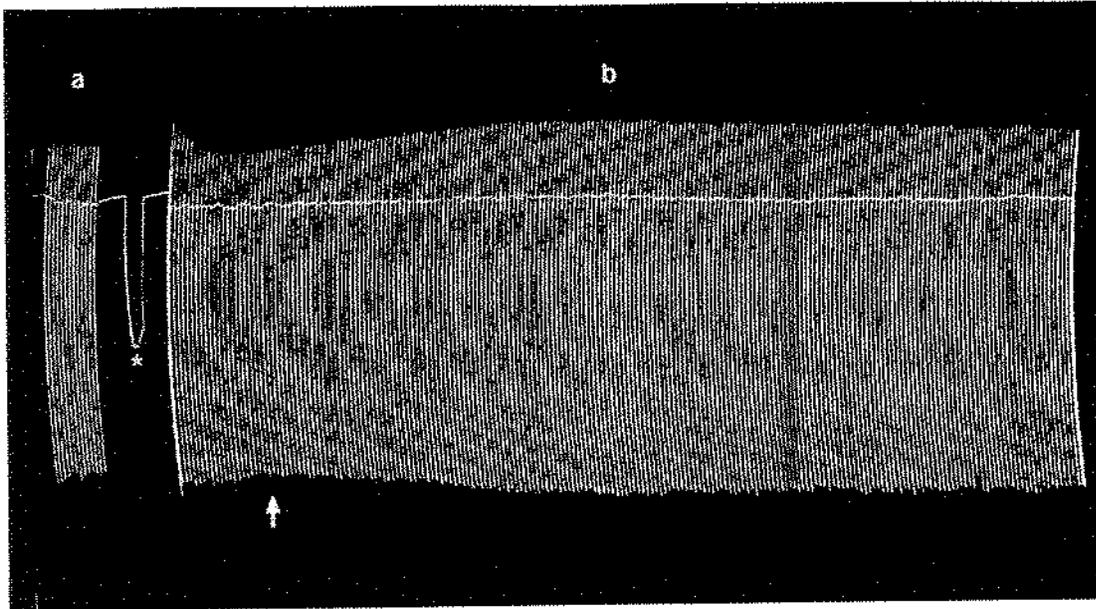


Figura 14 - Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) sobre as respostas musculares da preparação hemidiafragma desnervado de rato, sob estimulação elétrica direta.
a-Registro controle e * adição de acetilcolina ($14,6 \times 10^{-6}$ M)
b-↑ adição de quinidina e registro das respostas musculares por 30 minutos.

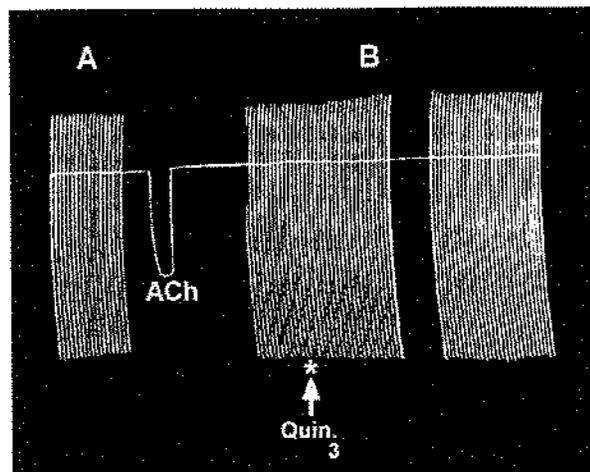


Figura 15 - Efeito da quinidina ($3,74 \times 10^{-6}$ M) sobre as respostas musculares da preparação hemidiafragma cronicamente desnervado de rato, sob estimulação elétrica direta.

A-Registro controle e adição de acetilcolina ($14,6 \times 10^{-6}$ M)

B-* adição de quinidina e registro por 30 minutos.

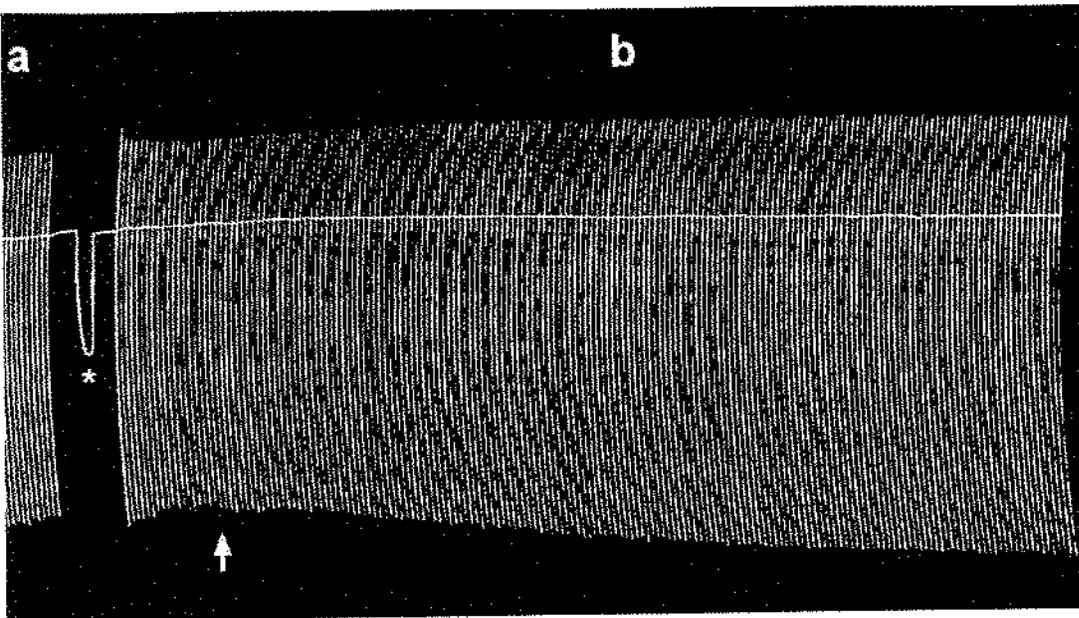


Figura 16 - Efeito da 4-aminopiridina (53×10^{-6} M) sobre as respostas musculares da preparação hemidiafragma cronicamente desnervado de rato, sob estimulação elétrica direta.

a- registro controle e * adição de acetilcolina ($14,6 \times 10^{-6}$ M)

b- ↑ adição de 4-aminopiridina e registro por 30 minutos

4.3 - POTENCIAIS BIOELÉTRICOS:

4.3.1 - REGISTRO DO POTENCIAL DE MEMBRANA

A leitura do potencial de membrana foi realizada a cada 5 minutos após a adição da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) durante 30 minutos. Antes da adição desta foi estabelecido um controle.

Os resultados mostraram que não houve alteração no potencial de membrana (Tabela 5).

TABELA 5 - Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) sobre o potencial de membrana (mv) na preparação nervo frênico-diafragma de rato.

EXPERIMENTO	CONTROLE	05'	10'	15'	20'	25'	30'
1	82,0	83,6	85,6	82,6	84,4	84,8	82,8
2	81,6	81,0	82,4	84,4	86,0	85,6	88,0
3	81,2	78,4	76,8	81,2	80,8	78,4	81,2
média	81,6	81,0	81,6	82,73	83,73	82,93	84,0
erro padrão	$\pm 0,28$	$\pm 1,83$	$\pm 3,14$	$\pm 1,13$	$\pm 1,88$	$\pm 2,79$	$\pm 2,51$

Obs:

1-Os valores acima correspondem à medida do potencial de membrana em mv.

2-A análise estatística indicou que as médias obtidas não são significativas estatisticamente.

4.3.2 - REGISTRO DO POTENCIAL DE PLACA TERMINAL EM MINIATURA

A captação dos potenciais de placa terminal em miniatura com a utilização de microeletrodos foi realizada aos 15 minutos e aos 30 minutos, após a adição da droga em estudo, tendo sido realizado um controle antes da adição da droga.

Nos experimentos com a finalidade de avaliar os efeitos da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) sobre o potencial de placa terminal em miniatura (mepp's) constatou-se aumento na frequência dos mesmos $69,3 \pm 7,4\%$ (n=5), (Figura 17).

2 seg | 1 mV

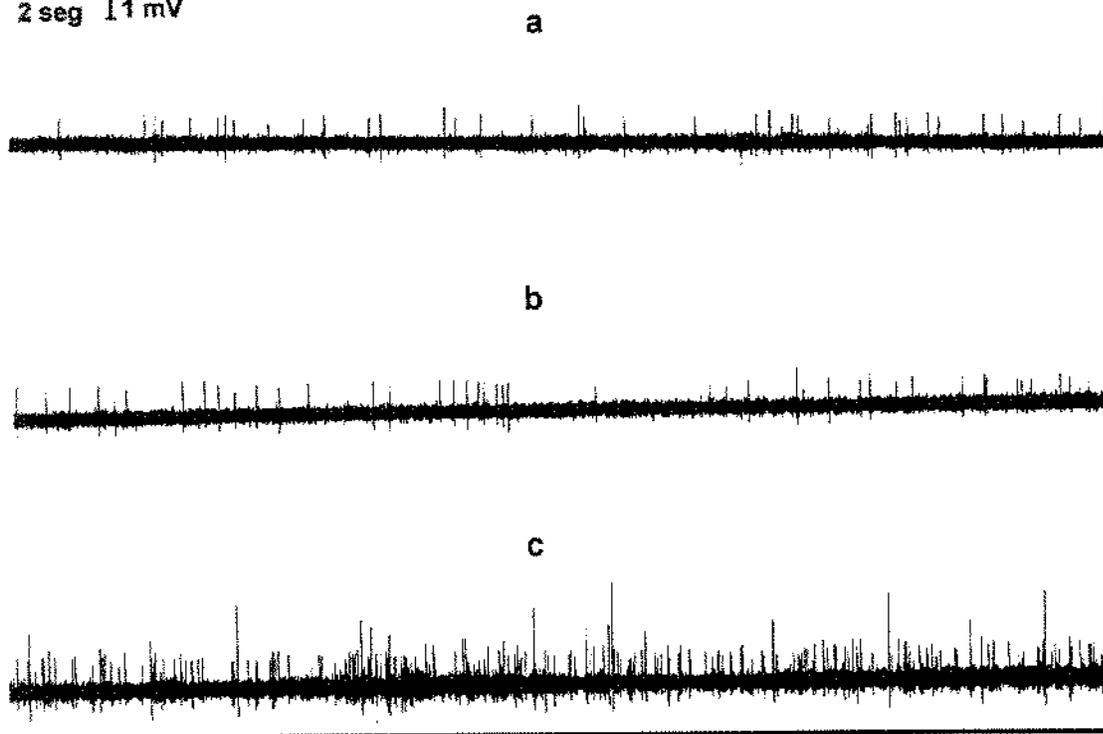


Figura 17 - Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) sobre os potenciais de placa terminal em miniatura, na preparação nervo frênico-diafragma de rato.

a- controle

b- 15 minutos após adição de quinidina

c- 30 minutos após adição de quinidina

4.3.3 - REGISTRO DO POTENCIAL DE AÇÃO

Estudos sobre o potencial de ação foram realizados na preparação frênico-diafragma de rato cujos experimentos tiveram a adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M).

Os resultados dos experimentos acima demonstraram que a quinidina prolonga a duração do potencial, tendo havido um aumento de $50 \pm 0,05\%$ ($n=5$) (Figura 18).

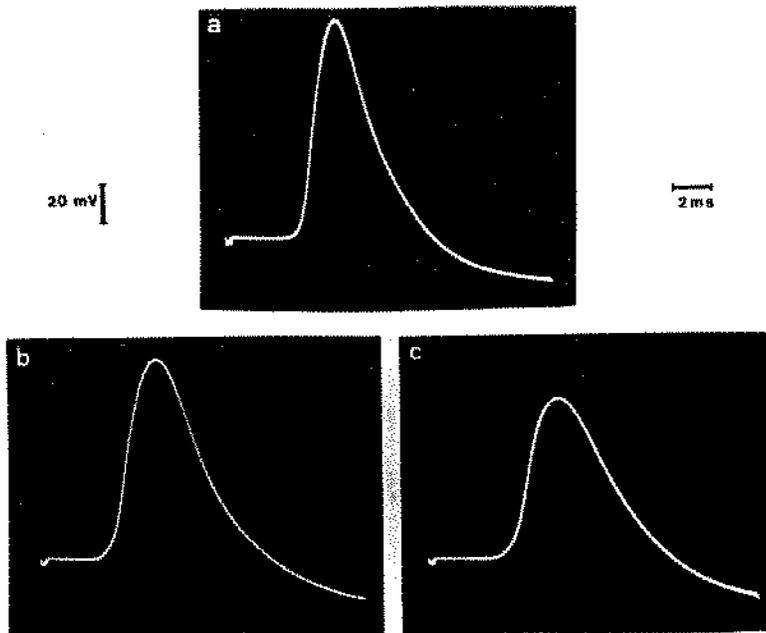


Figura 18 - Efeito da quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M) sobre o potencial de ação muscular, da preparação nervo frênico-diafragma de rato.

a-Registro controle

b-registro após 15 minutos da adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

c-registro após 30 minutos da adição de quinidina ($1,87 \times 10^{-6}$ M)

5 - DISCUSSÃO

As drogas podem atuar no canal de potássio de três formas: bloqueando, retardando o seu fechamento ou ativando. Os nossos resultados: aumento na amplitude das contrações do músculo diafragma, curarizado ou não curarizado, aumento na frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura e aumento na duração dos potenciais de ação, sugerem que a quinidina atue bloqueando o canal de potássio.

HARVEY (1939) demonstrou que a quinidina também causava aumento na tensão das respostas provocadas por estímulos máximos nas preparações músculo tibial anterior, músculo sóleo de gato e sartório isolado de sapo, em preparações normais, curarizadas e desnervadas.

Na preparação nervo frênico diafragma de rato curarizado observamos aumento na amplitude das contrações induzido pela quinidina. Este aumento poderia ser decorrente de uma atividade liberadora de neurotransmissor, porém esta possibilidade é descartada em função de, na preparação curarizada, a quinidina também produzir aumento da amplitude das contrações. É importante lembrar que a concentração de d-tubocurarina no banho é suficientemente alta para ser antagonizada.

LAMMERS & RITCHIE (1955) também verificaram que a tensão das respostas musculares eram maiores quando utilizada quinidina - isômero da quinina - na mesma dose da quinina, realçando o efeito destas sobre o músculo esquelético.

MILLER *et al* 1967 também observaram aumento na amplitude das respostas musculares na presença de quinidina, porém não determinaram o mecanismo envolvido neste aumento.

BALZER (1972), sugeriu que a quinidina inibia o transporte ativo de cálcio, em vesículas do retículo sarcoplasmático isoladas do coelho, por competição com este íon. De acordo com BALZER (1972), a quinidina inibiria o canal de cálcio o qual influenciaria a contração muscular. Porém os nossos resultados demonstraram, contrariamente que, a quinidina em músculo esquelético provavelmente, aumenta a permeabilidade aos íons cálcio uma vez que utilizando solução nutritiva com baixo teor de cálcio, continuou produzindo aumento na amplitude das contrações.

SENGES *et al* 1973 estudaram em preparação neuromuscular de mamífero, os efeitos da quinidina. Esses autores observaram aumento da força de contração e duração do potencial de ação. Esses resultados corroboram aqueles apresentados no presente estudo.

ANDERSON (1972) utilizando fibras musculares dissecadas de músculo semi-tendinoso de rã obteve aumento na amplitude das contrações seguido de uma diminuição na duração do potencial de ação. Em contradição a estes resultados ficou demonstrado, no presente trabalho, que a quinidina aumenta a amplitude das contrações além de aumentar a duração do potencial de ação, sugerindo um bloqueio do canal de potássio.

A 4-aminopiridina foi utilizada a título de comparação, uma vez que o mecanismo de ação desta droga é conhecido. As aminopiridinas bloqueiam o canal de potássio voltagem dependente (YEH *et al* 1976). Devido esta ação, elas prolongam a duração do potencial de ação prolongando assim a fase de repolarização e conseqüentemente a despolarização da membrana do terminal nervoso (BRIGANT & MALLART 1982). Este último efeito causa um aumento no influxo de cálcio para dentro do

terminal nervoso e aumento do número de quanta e neurotransmissor, liberado pelo impulso nervoso (MOLGO *et al.*, 1977, 1979; DURANT & MARSHALL, 1978; LUNDH, 1978). As aminopiridinas não aumentam a liberação de acetilcolina na ausência de impulsos nervosos (MOLGO *et al.*; 1977, 1979). Porém em grandes concentrações e após 30 a 40 minutos elas podem induzir descargas de potencial na ausência de estimulação de nervos, e liberação de Ach (MOLGO *et al.*, 1985). Este efeito, devido a instabilidade da membrana axonal é também atribuído ao bloqueio do canal de potássio. (VITAL BRAZIL *et al.*, 1995).

De fato, tanto a 4-aminopiridina como a quinidina exibiram atividade farmacológica semelhante, ou seja, em todos os experimentos realizados verificaram-se aumento na amplitude das contrações, bem como aumento na duração do potencial de ação. Além disso, mesmo na preparação curarizada ambas as substâncias induziram aumento na força de contração muscular. Reforçando a hipótese de que este aumento decorra principalmente de uma ação ao nível de canal de potássio e não por uma ação liberadora de acetilcolina.

Em preparações cronicamente desnervadas, tanto a quinidina como a 4-aminopiridina produziram um discreto efeito facilitador. Na preparação hemidiafragma cronicamente desnervada o potencial de repouso está em torno de -60 mV ao contrário dos valores -85 mV ou -90 mV da preparação inervada (FONTANA, 1982). Esse valor (-60 mV) é devido a uma diminuição na permeabilidade ao potássio (potencial de membrana é diretamente dependente da permeabilidade ao potássio).

De fato GINSBORG & JENKINSON (1976); relatam alterações importantes quando a preparação de músculo

esquelético é desnervada, alteração da sensibilidade à ação da tetrodotoxina e rompimento da proporção entre receptores nicotínicos e canais de sódio. Assim uma possível explicação para o aumento não significativo sobre a amplitude das contrações, na presença de quinidina e 4-aminopiridina, na preparação cronicamente desnervada, é que nesta preparação talvez também possam ocorrer alterações para os canais de potássio.

Nos experimentos em que o teor de cálcio da solução nutritiva foi reduzido, foi possível concluir que a concentração de cálcio ao nível do retículo sarcoplasmático é dependente da concentração extracelular. Portanto o aumento na amplitude das contrações persiste, em presença de quinidina, mesmo quando o teor de cálcio da solução nutritiva é reduzido quatro vezes. Tais resultados corroboram a hipótese inicial de que a quinidina não atua ao nível de canal de potássio ativado pelo cálcio.

A aplicação externa de bloqueadores iônicos: La^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , verapamil e nifedipina bloqueia o influxo de cálcio (POST. & NICOLSON, 1982). Logo, experimentos conduzidos com quinidina em presença de nifedipina não interferiu com o desempenho da quinidina. Portanto fica descartado o papel do cálcio no efeito facilitador da quinidina sobre as contrações musculares.

Os estudos feitos por COOK & HAYLETT, (1984) demonstraram os efeitos da quinina e quinidina sobre canais de potássio ativado pelo cálcio em hepatócitos de cobaia. Na presença de quinina e quinidina ocorreu inibição dos canais de potássio. Este estudo reforça a hipótese de que a quinidina aumenta a amplitude das respostas musculares por uma ação bloqueadora sobre o canal de potássio.

DREYER & PENNER (1987) estudaram a ação de toxinas de cobras sobre correntes de potássio da membrana do terminal nervoso de camundongos. Tais toxinas tiveram seus efeitos comparados a certos bloqueadores de canal de potássio, como tetraetilamônio e as diaminopiridinas; que por sua vez causam despolarização da membrana e aumentam o influxo de cálcio. O mesmo resultado, é também obtido com diaminopiridina, as aminopiridinas e possivelmente a quinidina.

FUJII *et al* (1990) descreve em seus experimentos o uso de bloqueadores de canal de potássio (tetraetilamônio, 4-aminopiridina, procaína, quinidina, apamina) atuando sobre o influxo de potássio, atividade elétrica e mecânica em bexiga de cobaia e, interagindo tais bloqueadores com os efeitos da cromakalina.

Nos experimentos realizados com a cromakalina e quinidina, os resultados demonstraram que a cromakalina, na vigência dos efeitos máximos causados pela quinidina, diminuí a amplitude das contrações. Este efeito, não descrito na literatura, em preparações de músculo esquelético, corrobora a hipótese de que a quinidina causa bloqueio no canal do potássio. Resultando no aumento da amplitude das contrações musculares e em decorrência do aumento na duração do potencial de ação, maior dificuldade de repolarização e despolarização prolongada. A cromakalina reverte o aumento na amplitude das contrações, diminuindo estas ao nível do controle, porque ela causa uma ativação dos canais de potássio, envolvidos no aumento das respostas musculares.

De acordo com FUJII *et al*. (1990) a cromakalina causou um aumento no influxo de potássio, que foi totalmente abolido pela quinidina na concentração de 5×10^{-5} M. Desta forma encontramos

suporte nos resultados de FUJII *et al* 1990, apesar de seu estudo ter sido realizado em preparações de músculo liso.

Relacionando os nossos estudos com os de McPHERSON (1993) sobre correntes e abertura de canais de potássio, onde utilizou drogas como cromakalina e glibenclamida em preparações de músculo liso, cardíaco e esquelético, McPHERSON sugere que além do tecido cardíaco os canais de potássio ATP dependente (K_{ATP}) tem sido caracterizados tanto em músculo liso vascular, não vascular e no músculo esquelético. Como sempre, a função fisiológica dos canais de K_{ATP} nestes tecidos é de difícil identificação. Este estudo revela o uso da cromakalina na abertura de canais de potássio. Em convergência aos nossos resultados, quando utilizamos esta na presença da quinidina, houve um antagonismo, diminuindo o aumento da amplitude das contrações causado pela quinidina.

Desta forma podemos avaliar que a cromakalina, uma vez que ativa canais de K_{ATP} em músculo liso, parece também agir como ativadora destes canais em músculo esquelético.

UITDEHAAG (1994) estudou os efeitos benéficos clínicos da 4-aminopiridina e da quinidina na esclerose múltipla. O uso da quinidina e da 4-aminopiridina foi baseado na facilitação da condução em axônios bloqueados pela desmielinização, produzida por estas drogas, devido ao bloqueio dos canais de potássio nestas fibras.

Alguns bloqueadores de canal de potássio foram utilizados no estudo sobre a proliferação de células neoplásicas, no carcinoma mamário. Dentro destes estava a quinidina, 4-aminopiridina, glibenclamida. Foi examinado a sensibilidade da proliferação destas células perante tais bloqueadores. A quinidina

e glibenclamida inibiam a proliferação das células, concluindo-se que a quinidina inibia K_{ATP} em carcinoma mamário, inibindo uma fase do ciclo da proliferação celular (WOODFORK, *et al* 1995). Reforçando a nossa hipótese de que a quinidina bloqueia canal de potássio ATP dependente, cuja inibição também ocorre na preparação de músculo esquelético.

A inibição de canais de potássio ATP dependente pela disopiramida em miócitos ventriculares de gato foi estudada e comparada com a produzida pela quinidina (de LORENZI, 1995). A indução dos canais de potássio ATP dependente pela L-cromakalina era dose dependente. Neste estudo a disopiramida inibia os canais de potássio ATP dependente, assim como a quinidina. A inibição destes canais contribui para preservar a habilidade da quinidina para prolongar a duração do potencial de ação sem comprometer o potencial de membrana.

Este efeito também foi obtido por nós em músculo esquelético onde houve bloqueio do canal de K^+ , aumentando a duração no potencial de ação sem ocorrer alteração no potencial de membrana.

6 - CONCLUSÕES

1- ESTUDOS MIOGRÁFICOS :

1.1 - Confirmando dados da literatura, verificou-se que, nas preparações inervadas, a quinidina causou um aumento, dependente da dose, da amplitude das contrações induzidas por estímulos indiretos -via nervo frênico - ou diretos, fenômeno este que persistiu nas preparações curarizadas e nas cronicamente desnervadas embora, nestas últimas, o aumento percentual tenha se revelado significativamente menor. Não houve queda significativa desse efeito facilitador na vigência da redução da concentração de cálcio no líquido nutriente para níveis iguais ou inferiores a 0,9 mM. Este fato sugere ausência da participação dos canais de cálcio ou mesmo a participação de canais de potássio ativados pelo cálcio, no aumento da amplitude das contrações induzido pela quinidina.

1.2 - A adição de 4-aminopiridina ao banho causou efeitos análogos aos da quinidina, inclusive no que concerne à acentuada queda desses efeitos nas preparações desnervadas. A adição de ambas as substâncias ao banho, iniciando-se pela 4-aminopiridina, seguida da quinidina, ou aplicando-as em ordem inversa, revelou um sinergismo de adição em termos de aumento de amplitude de contração dos diafragmas sob estimulação indireta. Este fato sugere que ambas as substâncias estejam atuando no mesmo local, isto é canais de potássio sensíveis a 4-aminopiridina.

1.3 - Com efeito a presença de concentrações de cromakalina (1×10^{-4} M) reconhecidamente capaz de ativar os canais de potássio dependentes ATP, determinou-se uma redução significativa da amplitude de contração das preparações, da ordem de 60%, quando comparadas ao aumento induzido pela quinidina,

indicando que, de forma análoga ao descrito para as musculaturas lisas vascular e não vascular, a quinidina aumentaria a amplitude das contrações dos músculos esqueléticos através de bloqueio de canais de potássio, possivelmente os dependentes ATP.

2. ESTUDOS ELETROFISIOLÓGICOS:

2.1 - Confirmando os dados referidos em estudos eletrofisiológicos, verificamos que a quinidina aumenta, de forma significativa, a frequência dos potenciais de placa terminal em miniatura das preparações frênico diafragma isoladas. O que sugere que a mesma atue em canal de potássio da terminação nervosa.

2.2 - Em concentrações eficazes, a quinidina não alterou de forma significativa o potencial de membrana muscular o que confirma um possível mecanismo de ação envolvendo canais de potássio.

2.3 - O mesmo não ocorreu com o potencial de ação muscular, cuja duração aumentou de forma significativa, na presença de quinidina, em torno de 50% comparativamente ao valor controle, fato que igualmente caracteriza as substâncias que atuam sobre o canal de potássio.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ADAMS, D. J. & NONNER W. (1990). - Voltage-dependent potassium channels: gating, ion permeation and block. In Potassium channel: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential (Editado por COOK N. S.) Ellis Horwood, Chichester.
- ANDERSON, K. E. (1972) - Effect of clorpromazine, imipramine and quinidine on action potencial and tension development in single skeletal muscle fibres of the frog. Acta Physiol. Scand 88 : 330-341.
- ASHFORD, M. L. (1990) - Potassium channel and modulation of insulin secretion. In Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential (Editad por COOK N. S.), Ellis Horwood, Chichester.
- BALZER, H. (1972) - The effect of quinidine and drugs with quinidine-like action (propranolol, verapamil, and tetracaine) on the sarcoplasmic reticulum vesicles of rabbit skeletal muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, 256-272.
- BIGGER, J. T. Jr & HOFFMAN, B. F. (1990) - Drogas antiarrítmicas em Bases Terapêuticas da Farmacologia, GOODMAN & GILMAN, 6ª edição, 491.
- BRIGANT, J. L. & MALLART, A. (1982) - Presynaptic currents in mouse motor endings. J. Physiol. 333, 619-636.
- BÜLBRING, E. (1946) - Observations on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation on the rat. Brit. J. Pharmacol. , 1: 38.

- COOK, D. L. & HALES C. N. (1984). - Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic β -cells. Nature 311, 271-273.
- COOK, N. S. & QUAST, U. (1990) - Potassium channel pharmacology. In Potassium Channel: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential (Editado por COOK, N. S.) Ellis Horwood, Chichester.
- COOK, N.S. & HAYLETT, D. G. (1985) - Effects of apamin, quinine and neuromuscular blockers on calcium-activated potassium channels in guinea pig hepatocytes. J. Physiol., 358, 373-394.
- DREYER, F. & PENNER, R. (1987) - The actions of presynaptic snake toxins on membrane currents of mouse motor nerve terminals. J. Physiol. (Lond.) 386, 455-463.
- FONTANA, M.D. & VITAL BRAZIL, O. (1976) - Efeitos da quinidina e procainamida sobre a excitabilidade do músculo sartório do sapo (Bufo sp). Ciência e Cultura 28 (7) (Supl.) 549.
- FONTANA, M. D. (1982) - Modo de ação da peçonha da Phoneutria nigriventer na junção neuromuscular e no músculo esquelético. Tese de Doutorado, apresentada ao INSTITUTO de BIOLOGIA, UNICAMP.
- FONTANA, M.D. & VITAL BRAZIL, O. (1974) - Sobre o mecanismo de potencialização causado pela quinidina e procainamida sobre o bloqueio neuromuscular produzida pela d-tubocurarina. Ciência e Cultura 26 (7) (Supl.): 524.

- FUJII, K.; FOSTER, C. D.; BRADING, A. F. & PAREKH, A. B. (1990) - Potassium channel blockers and the effects of cromakalim on the smooth muscle of guinea-pig bladder. Br J. Pharmacol., 99 779-785.
- GINSBORG, B. L. and JENKINSON, D. H. (1976) - Transmisson of impulse from nerve to muscle. In ZAIMIS, E., Neuromuscular Junction, Berlin,-229.
- HARVEY, A. L. & MARSHALL, I.G. (1977).- The facilitation actions of aminopiridines and tetraethylamonium on neuromuscular transmission and muscle contractility in avian muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 299: 53.
- HARVEY, A.M. (1939) - The action of quinidine on skeletal muscle. J. Physiol. , 95 45-67.
- HAYLETT, D.G. & JENKINSON, D. H. (1990) - Calcium activated potassium channels. In: Potassium Channels: Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential (Editado por COOK, N.S.) Ellis Horwood, Chichester.
- HONDEGHEM, L.M. & MASON, J. W. (1995) -Drogas antiarrítmicas, Farmacologia Básica e clínica - KATZUNG, B. G. 6ª edição
- LAMMERS, W & RITCHIE, J. M. (1955).- The action of quinidine on the contractions of striated muscle. J. Physiol. 129 412-423.
- LONGMORE, J.; NEWGREEN D. T. & WESTON, A. H. (1990) - Effects of cromakalim, RP 49356, diazoxide, glibenclamide and galanin in rat portal vein. Eur. J. Pharmac. 190, 75-84.

- LORENZI, F. G.; BRIDALI, T. R. & SPINELLI, W. (1995) Voltage-dependent inhibition of the ATP-sensitive K^+ currents by the class 1^a agent disopyramide in cat ventricular myocytes. J. Pharmacol., 272 (2) 714-723.
- LUNDH, H. (1978) Effects of 4-aminopyridine on neuromuscular transmission. Brain Res. 153, 307-318.
- McPHERSON, G.A. (1993). - Current trends in the study of potassium channel openers. Gen. Pharmac. 24, n°2, 275-281.
- MILLER, R. D.; WAY, W.L & KATZUNG, B. G. (1977) - The potentiation of neuromuscular blocking agents by quinidine. Anesthesiology, 28 (6): 1036.
- MILLER, R. D.; WAY, W.L. & KATZUNG, B. G. (1968) - The neuromuscular effects of quinidine. Proc. Soc. Exp. Med., 129 (1):215
- MOLGO, J.; LEMEIGMAN, M. & LECHAT, P. (1977). - Effects of 4-aminopyridine at the frog neuromuscular junction. J. Pharmacol. Exper. Ther. 203, 653-663.
- MOLGO, J.; LEMEIGMAN, M. & LECHAT, P. (1979). - Analysis of the action of 4-aminopyridine during repetitive stimulation at the neuromuscular junction. Eur. J. Pharmacol. 53, 307-311.
- NOMA, A. (1993) - ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. Nature 305, 147-148.
- PELLASSY, C.; AUSSEL, C. (1993) - Effect of cinchona bark alkaloids and chlorquine on phospholipids synthesis J. Pharmacol. jul 47(1) 28-35.

- POST, G. & NICOLSON, G. L. (1980) - Membrane potassium channels. In: Carl W.C. ed. The cell and neuronal functions. North Holland publishing Company, 6, 50-79.
- SCHIMIDT, J. L. (1963) - The effect of quinidine on the action of muscle relaxants. J.A.M.A., 183 (1): 669
- SCHMID-ANTOMARCHI H., De WEILLE, J.; FOSSET, M. & LAZDUNSKI M. (1987) . The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP- modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells. J. biol. Chem. 262, 15840-15844.
- SENGES, J.; RÜDEL, R. & KUHN (1973). - Effects of quinidine, procainamide and n-propyl-ajmaline on skeletal muscle. Naunyun-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276, 25-33.
- SPRUCE, A. E.; STANDEN, N. B.; AND STANFIELD, P.R. (1986) Rubidium permeability of ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. Nature 316, 736-738.
- UITDEHAAG, B. M.; POLMAN, C. H.; de GROOT, C.J. (1994) - Effect of blockers on the clinical course and histological features of experimental allergic encephalomyelitis. Acta-Neurol-Scand. 90(4), 299-301.
- ULBRICHT, W. & WAGNER, H. H. (1976). - Block of potassium channels of the nodal membrane by depolarization. Pflügers Arch. 367, 77-87.

- VITAL BRAZIL, O. (1965) - Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. "O Hospital". 68(4).
- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA M. D. & HELUANY, N. F. (1995). - Mode of action of the coral snake *Micrurus Spixii* venom at the Neuromuscular junction. J. of Natural Toxins, 4, nº1, 19-33.
- WILSON, C.; & BUCKINGHAN, R. E. (1988) - "In vivo" and "In vitro" studies of cromakalim and glibenclamide in rat. Brit. J. Pharmac. 93, 126p.
- WOODFORK, K.A.; WONDERLIN, W.F.; & PETERSON V.A (1995) - Inhibition of ATP-sensitive potassium channels causes reversible cell-cycle arrest of human breast cancer cells in tissue culture. J. Cell Physiol. 162(2) 163-171.
- YEH, J. Z.; OXFORD, G. S.; WU, C.H. & NARAHASHI, T. (1976) Dynamics of aminopyridine block of potassium channel in squid axon membrane. J. Gen. Physiol. 68, 519-535.

8 - ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the mechanism whereby quinidine increases the amplitude of muscle contractures.

The experiments were performed using rat phrenic nerve-diaphragm preparations incubated in Tyrode solution at 37°C and oxygenated with a mixture of 95% O₂ 5%CO₂. In the absence (n=5) and presence (n=5) of curare (dTC, 14.6x10⁻⁶ M), the addition of quinidine (1.87x10⁻⁶ M) resulted in a 58,57% and 20.8±5.1% increase in the amplitude of contractions, respectively. Under the same conditions, 4-aminopyridine (53x10⁻⁶ M.) caused a similar potentiation of the contractions, viz. 78.3±13.9% and 30.1±3.8%, respectively. When 20x10⁻⁵ M nifedipine was added 30 min previously, the above dose of quinidine produced a 18,75%% increase in the amplitude of contractions (n=5). Quinidine increased the action potential duration by 50,0±0.5% (n=5). Similarly, there was a 69,3±7,14% increase in the frequency of miniature endplate potentials (n=5). Cromakalim (K. Fujii, *Br J Pharmacol* **99**, 779-785,1990) partially inhibited the increase in the amplitude of muscle contractions induced by quinidine (n=6).

The above results suggest that the increase in muscle contraction amplitude observed in the presence of quinidine is mediated via an action of this drug on potassium channels.